

GENETICKÁ CHARAKTERIZACE SMRKU ZTEPILÉHO POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

LESNICKÝ PRŮVODCE



Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D

Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D



Certifikovaná metodika

8/2015

Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů

Certifikovaná metodika

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Strnady 2015

Lesnický průvodce 8/2015

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

<http://www.vulhm.cz>

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 978-80-7417-102-4

ISSN 0862-7657

GENETIC CHARACTERIZATION OF NORWAY SPRUCE 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 Norway spruce 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 Norway spruce were used to develop this methodology. Nine selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters and verifying the clonal identity.

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

Oponenti: Ing. Miroslav Válek, ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Biotechnologické centrum ZF JU
v Českých Budějovicích

Adresa autorů:

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	15
d.	Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů	16
e.	Zpracování molekulárních dat	17
III.	Srovnání novosti postupů	18
IV.	Popis uplatnění metodiky	18
V.	Ekonomické aspekty	21
VI.	Dedikace	23
VII.	Seznam použité související literatury	23
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	25
	Summary	26
	Příloha	27

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 smrku ztepilého a představit postupy ověřování příslušnosti ramet (jedinců) náležejícím k určitému ortetu (klonu) na modelovém semenném sadu smrku ztepilého.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

Smrk ztepilý *Picea abies* (L.) Karsten je jednou z našich nejvýznamnějších dřevin z ekonomického i ekologického hlediska. Jeho rozšíření sahá od Sibíře přes severovýchodní a severní Evropu. Zejména v posledních dvou stoletích byl intenzivně uměle vysazován i ve střední Evropě, kde vytlačil řadu původních dřevin (SCHUBERT et al. 2001). Je to světlomilná dřevina, s relativně mělkou povrchovou kořenovou soustavou. Je značně náročný na půdní vlhkost a vyžaduje i vyšší relativní vlhkost vzduchu. Nedostatek vláhy je limitujícím faktorem jeho dobrého růstu. Snese i nadbytečnou vlhkost rašeliníšť (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Na geologické podloží a složení půdy nemá velké nároky, i když na chudých křemitých půdách a kyselých rašelinách roste špatně, protože nesnáší nedostatečně provzdušněné půdy (CHMELÁŘ 1980). Na klimatické podmínky není náročný, ale málo odolává větru a také námraze a sněhu. Je rovněž velmi citlivý na znečištění ovzduší, zejména imisemi s SO_2 . Vývoj přirozené populace smrku ztepilého 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 stanovit DNA markery, které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a nejsou ovlivněny změnami vnějšího prostředí. 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 pro-

měnlivost populací jsou založeny na alelických frekvencích jednotlivých alelických variant v lokusech (PAULE 1992). Pro ověřování polymorfismu vybraných populací smrku ztepilého 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. Studium mikrosatelitů je u smrku ztepilého komplikované z důvodu značné velikosti jeho genomu, který je 19,6 GB dlouhý a obsahuje vysoký počet repetitivních oblastí (NYSTEDT et al. 2013). Ty způsobují tvorbu multilokusů, což komplikuje hodnocení amplifikačních produktů (SCOTTI et al. 2000). Mikrosatelitové markery již byly široce použity v mnoha genetických výzkumech např. pro sledování genetické diversity, analýzy toku genů, genomového mapování, identifikace jedinců, určení rodičovství apod. (PFEIFFER et al. 1997; CHRISTIAKOV et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2006). U druhu smrku byla pomocí mikrosatelitových markerů zjišťována genetická diversity a diferenciace mezi populacemi např. u *Picea abies* (SCOTTI et al. 2006), *Picea asperata* (WANG et al. 2005), *Pinus brutia* a *Pinus eldarica* (BUCCI et al. 1998), *Pinus canariensis* (NAVASCUÉS et al. 2006), *Pinus halepensis* a *Pinus pinaster* (GÓMEZ et al. 2005), *Pinus strobus* (MARQUARDT, EPPERSON 2004).

Účelem zpracovávaných metodických postupů bylo vybrat vhodné polymorfní mikrosatelitové markery a optimalizovat postupy polymerázové řetězové reakce (PCR) pro získání jednotlivých reprodukovatelných amplifikátů a po statistickém zpracování velikostí alel získat genetické charakteristiky šetřených populací. 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. Vývoj přirozené populace závisí na rozmanitosti genomů jedinců, kteří ji vytvářejí. 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 diversity.

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 např. pro formulaci dotační politiky v oblasti podpory zachování a reprodukce genofondu lesních dřevin ap.

2. Metodické postup

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 polysacharachidů se snižuje kvalita i kvantita vyizolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR amplifikace. 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 označují, ukládají se do mikroténového sáčku a udržují 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 přijmutí vzorků je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, 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 vzorky na ledu. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se nejlépe osvědčila metoda pomocí kitu 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. Nechá se nahřívat inkubační lázeň na 65 °C a 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 použitím tekutého dusíku aplikovaného na rostlinný materiál v třecích miskách. Rozdrcený materiál se přendá se do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl Rnázylu, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2–3x 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 rpm.
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2 ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm.
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5 ml 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 pipetováním promícháme.
7. Odpipetujeme 650 µl směsi a přemístíme do Dneasy Mini spin kolonky umístěné v 2 ml 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 2 ml zkumavky, přidáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500 µl 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 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 µl 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 vybavení:

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

U vyzolované DNA lze zjistit koncentraci v ng/μl a čistotu (na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm) přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 10–50 ng/μl z mladých jehlic, z pupenů se pohybovaly hodnoty i nad 300 ng/μl. Hodnoty optimální čistoty by se měly pohybovat v rozmezí 1,7–1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších látek (proteinů, fenolických látek). Čistota DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. Vzorky DNA s vyšší koncentrací byly pro PCR reakce naředěny na hodnotu cca 50 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 9 polymorfních mikrosatelitových lokusů PAAC23, PAAC19 z publikace SCOTTI et al. (2000), SpAGD1 z publikace MELNIKOVA et al. (2012), WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03 z publikace RUNGIS et al. (2004), 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 9 lokusy byly sestaveny do tří multiplexů. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce, 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: AACTCCAAACGATTGATTCC	141-207
SpAGD1	F: GTCAACCAACTT F: GTCAACCAACTTGTAAGCCA R: ACTTGTGGCATTTCCTCC	115-172
WS00716.F13	F: TCAAGTAATGGACAAACGATACA R: TTTCCAATAGAATGGTGGATT	180-288
WS0092.A19	F: GATGTTGCAGGCATTGAGAG R: GCACCAGCATCGATTGACTA	207-247
WS0022.B15	F: TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG R: TGGCTTTTTATTCCAGCAAGA	166-214
WS0073.H08	F: TGCTCTCTTATTCGGGCTTC R: AAGAACAAGGCTTCCCAATG	182-216
WS00111.K13	F: GACTGAAGATGCCGATATGC R: GGCCATATCATCTCAAAATAAAGAA	209-271
WS0023.B03	F: AGCAGCTGGGGTCAAAGTT R: AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG	162-236

Protokoly PCR:**Multiplex 1 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů):**

PAAC19 F – 2 µM, PAAC19 R – 2 µM

SpAGD1 F – 2 µM, SpAGD1 R – 2 µM

PAAC23 F – 4 µM, PAAC23 R – 4 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 zásobního roztoku primerů PAAC19 F – 2 µl, PAAC19 R – 2 µl, SpAGD1 F – 2 µl, SpAGD1 R – 2 µl, PAAC23 F – 4 µl, PAAC23 R – 4 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 (In-vitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 µl na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 × 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 × PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Počet cyklů	Teplota	Čas	Popis
1	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
37	94 °C	45 sec	Denaturace
37	57 °C	45 sec	Annealing
37	72 °C	45 sec	Elongace
1	72 °C	45 sec	Finální elongace
1	4 °C	<i>úložná teplota</i>	Chlazení amplifikátů

Multiplex 2 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů):

WS00716.F13 F – 2 µM, WS00716.F13 R – 2 µM

WS0092.A19 F – 2 µM, WS0092.A19 R – 2 µM

WS0022.B15 F – 2 µM, WS0022.B15 R – 2 µM

Provedeme naředění primerů dle příkladu multiplexu 1.

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15 μ l na 1 vzorek s využitím Type-it® Microsatellite PCR Kit (Qiagen)

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
H ₂ O RNase – free	5 μ l
Qiagen Multiplex	7,5 μ l
Primers Mix	1,5 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

Teplotní režim PCR

Počet cyklů	Teplota	Čas	Popis
1	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
26	94 °C	30 sec	Denaturace
26	53 °C	90 sec	Annealing
26	72 °C	30 sec	Elongace
1	60 °C	30 min	Finální elongace
1	4 °C	<i>úložná teplota</i>	Chlazení amplifikátů

Multiplex 3 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů):

WS0073.H08 F – 2 μ M, WS0073.H08 R – 2 μ M

WS00111.K13 F – 2 μ M, WS00111.K13 R – 2 μ M

WS0023.B03 F – 2 μ M, WS0023.B03 R – 2 μ M

Provedeme naředění primerů dle příkladu multiplexu 1.

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15 μ l na 1 vzorek s využitím Type-it® Microsatellite PCR Kit (Qiagen)

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
H ₂ O RNase – free	5 μ l
Qiagen Multiplex	7,5 μ l
Primers Mix	1,5 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

Teplotní režim PCR

Počet cyklů	Teplota	Čas	Popis
1	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
26	94 °C	30 sec	Denaturace
26	55 °C	90 sec	Annealing
26	72 °C	30 sec	Elongace
1	60 °C	30 min	Finální elongace
1	4 °C	<i>úložná teplota</i>	Chlazení amplifikátů

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

Požadované přístrojové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné špičky, 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 × TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo GelRed (GelRed™ Nucleic acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium, Hayward), jedná se o náhradu dříve používaného ethidium bromidu, který má toxické účinky. 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 porovnání velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 µl standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 µl destilované vody a 2 µl pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání 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 vybavení:

analytické váhy, sada pipet a příslušné 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 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) 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 argonovým 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, jenž je přidáván ke všem vzorkům, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové 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), 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 diference mezi populacemi, heterozygotnost apod.. Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972).

V případě ověřování klonové identity se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů. 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.

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodické postupy získání genetických charakteristik populací smrku ztepilého vybraných na území České republiky a ověřování identity klonů v semenném sadu smrku ztepilého pomocí jaderných mikrosatelitových markerů nebyly dosud popsány. V současné době chybí objektivní podklady a komplexní informace o genové diverzitě lesních dřevin v ČR. Doposud získané poznatky vycházely převážně z hodnocení provenienčních ploch a z fenotypového šetření porostů. Z molekulárně-genetických metod byly pro smrk ztepilý použity izoenzymové analýzy (IVANEK 2006). Izoenzymy jsou až projevem genů, nestudují genom přímo jako DNA makery, a proto jejich složení může být negativně ovlivněno podmínkami prostředí. V případě semenného sadu 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 genomu jedinců s využitím analýz DNA pomocí polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů. Výstupem těchto analýz je zpracovaná genotypizace, což představuje databázi velikostí alel hodnocených lokusů k příslušným klonům. Příslušnost jedince ke klonu odpovídá, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. Pro získání informací o genetické proměnlivosti ze zkoumaných vzorků bylo potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Pro analýzy byly vybrány jaderné mikrosatelity PAAC23, PAAC19, SpAGD1, WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B03, jejichž amplifikace probíhala formou tří multiplexů.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Pro vývoj a ověření metodiky byly využity jedinci smrku ze 12 významných populací smrku ztepilého, rostoucích převážně v genových základnách na území České republiky a v semenném sadu CZ-3-3-SM-101-10-3-S. Vývoj přirozené populace závisí na rozsahu její genetické diverzity; čím jsou populace geneticky rozmanitější, tím se lépe přizpůsobí změnám podmínek na stanovišti. Prognóza dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě zjištění jejich genetické struktury. Znalost úrovně genetické diverzity, diferenciace 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 Janeiro a naplnění závěrů ministerských konferencí o ochraně lesů Forest Europe (Štrasburk 1990, Helsinky 1993, Lisabon 1998, Vídeň 2003, Varšava 2007 a Oslo 2011). 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 smrku ztepilého. Reprodukovatelnost této metody potvrzují shodné výsledky při opakovaných amplifikacích 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 9 vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů umožňuje potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Pro každý deklarovaný klon musí být zpracován soubor hodnot 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 28, 35 a 36, přičemž klonovou identitu prokazují klony 28 a 36. Jedinci deklarovaní ke klonu 35 nevykazují klonovou identitu.

Tab. 2: Ukázka zpracované genotypizace

Lokusy/ramety	PAAC19		PAAC23		SpAGD1		WS0022B15		WS00716.F13		WS0092.A19	
SM_SS_28_1	165	193	280	282	144	144	181	189	232	236	207	211
SM_SS_28_2	165	193	280	282	144	144	181	189	232	236	207	211
SM_SS_28_3	165	193	280	282	144	144	181	189	232	236	207	211
SM_SS_28_4	165	193	280	282	144	144	181	189	232	236	207	211
SM_SS_28_5	165	193	280	282	144	144	181	189	232	236	207	211
SM_SS_35_1	161	161	282	310	142	142	179	191	214	228	211	211
SM_SS_35_2	203	205	276	280	138	142	185	193	232	234	211	211
SM_SS_35_3	167	167	276	280	138	150	179	201	216	238	211	211
SM_SS_35_4	161	161	282	310	142	142	179	191	214	228	211	211
SM_SS_35_5	161	161	282	310	142	142	179	191	214	228	211	211
SM_SS_36_1	157	175	280	280	122	122	179	195	214	234	211	211
SM_SS_36_2	157	175	280	280	122	122	179	195	214	234	211	211
SM_SS_36_3	157	175	280	280	122	122	179	195	214	234	211	211
SM_SS_36_4	157	175	280	280	122	122	179	195	214	234	211	211
SM_SS_36_5	157	175	280	280	122	122	179	195	214	234	211	211

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 diverzitě a heterozygotnosti populací nebo porostů je přínos celospolečenský. Současně dochází i k naplňování cílů Národního programu – 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 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 vztažených k obmýtní u kvalitnějších smrkových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním smrkovým porostům na území ČR v objemu 81,04 m³/ha a při průměrné ceně surového dříví za rok 2014 ve výši 1 180 Kč/m³ 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 za ČR, která je každoročně zveřejňována ve Věstníku MZe, v roce 2014 činila 1 180 Kč/m³ 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 obmýtní, 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 výtěže v obmýtní (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 obmýtní, 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.

Náklady na postupy analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány s předpokladem základního přístrojového laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Dle předkládané metodiky jsou průměrné náklady spotřebního materiálu dle cenových kalkulací z roku 2015 na analýzu jednoho vzorku včetně izolace DNA, PCR amplifikací a fragmentační analýzy tří multiplexů při vlastnictví genetického analyzátoru 311,- 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. Při využití služeb komerčních laboratoří jsme při průzkumu trhu zjistili nejvýhodnější cenové nabídky od firmy SEQme. Předpokládaná cena na analýzu jednoho vzorku je 200,- Kč bez 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). Tedy u tří multiplexů, jak uvádíme v této metodice by byla cena 600,-Kč bez DPH plus náklady na izolaci DNA. 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.

VI. DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0115 (č.j. 5774/2015-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.
- CHMELAŘ J. 1980. Dendrologie s ekologií lesních dřevin. Část I. Jehličnany. Brno, Vysoká škola zemědělská v Brně: 83 s.
- 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.
- 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.
- IVANEK O. 2006. Výsledky isoenzymových analýz populací smrku ztepilého na plochách s různými stanovištními podmínkami. *Zprávy lesnického výzkumu*, 51: 32-37.
- 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.
- MARQUARDT P.E., EPPERSON B.K. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, 13: 3305-3315.
- MELNIKOVA M.N., PETROV N.B., LOMOV A.A., LA PORTA N., POLITOV D.V. 2012. Testing of microsatellite primers with different populations of Eurasian spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb. *Russian Journal of Genetics*, 48: 562-566.

- NAVASCUÉS M., VAXEVANIDOU Z., GONZÁLES-MARTÍNEZ S.C., CLIMENT J., GIL L., EMERSON B.C. 2006. Chloroplast microsatellites reveal colonization and meta-population dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology*, 15: 2691-2698.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-392.
- NYSTEDT B. et al. 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 497: 579-584.
- OLIVEIRA E.J., PÁDUA J.G., ZUCCHI M.I., VENCovsky R., VIEIRA M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- PAULE L. 1992. Genetika a šľachtenie lesných drevín. Bratislava, Príroda: 304 s.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.

- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- WANG Y., LUO J., XUE X., KORPELAINEN H., LI C. 2005. Diversity of microsatellite markers in the populations of *Picea asperata* originating from the mountains of China. Plant Science, 168: 707-714.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., MALÁ J.: Sledování genetické proměnlivosti chlumního ekotypu smrku ztepilého pomocí RAPD. (Studying of genetic variability of Norway spruce hurst ecotype by RAPD). Zprávy lesnického výzkumu, 56, 2011(2): 137-143.
- 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. 2014. 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.

GENETIC CHARACTERIZATION OF NORWAY SPRUCE USING MICROSATELLITE MARKERS

Summary

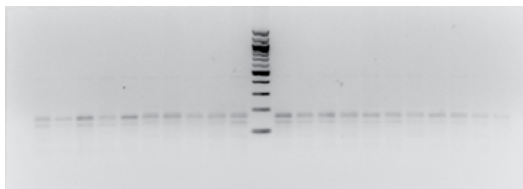
The Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karsten) is one of the most important tree species from both an ecological and economical point of view. Knowledge of the genetic structure of coniferous species populations, especially valuable ecotypes of Norway spruce, is very important in order to maintain the ecological stability of forests as well as for the optimization of timber production. This methodology presents the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization and clonal identification of *Picea abies* (L.) Karstein. 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. 20005), *Pinus brutia* a *Pinus eldarica* (BUCCI et al. 1998), *Pinus canariensis* (NAVASCUÉS et al. 2006), *Pinus halepensis* a *Pinus pinaster* (GÓMEZ et al. 2005), *Pinus strobus* (MARQUARDT a EPPERSON 2004). 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 for selected primers that were scanned in the publications PAAC23, PAAC19 (SCOTTI et al. 2000), SpAGD1 (MELNIKOVA et al. 2012), WS00716.F13, WS0092.A19, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0023.B0 (RUNGIS et al. 2004). The important populations and the seed orchard of Norway spruce were used to develop this methodology. Clear, reproducible PCR products were produced for all nine 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 Norway spruce.

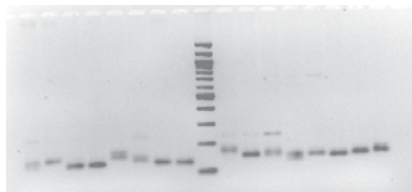
Příloha

Příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací smrku ztepilého

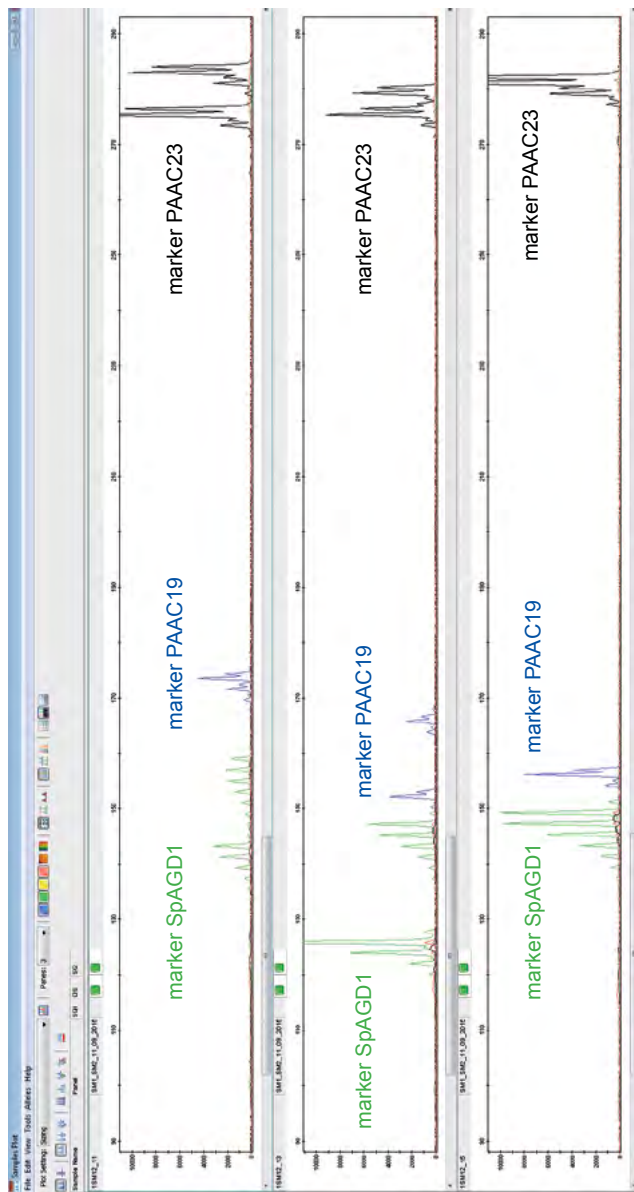
marker PAAC19



marker SpAGD1



Obr. 1: Příklad PCR amplifikátů na gelovém nosiči získaných s primery k lokům PAAC19 a SpADGD1



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

Tab. 3: Genetické charakteristiky vybraných nukleárních mikrosatelitových lokusů ze 427 sledovaných vzorků smrku ztepilého

Lokusy	Velikost PCR produktů (bp)	Na	I	H _o	H _e
PAAC23	266-314	10	1,607	0,676	0,689
PAAC19	141-207	16,6	2,483	0,499	0,895
SpAGD1	115-172	20,3	2,805	0,601	0,928
WS00716.F13	180-288	16,8	2,622	0,863	0,916
WS0092.A19	207-247	3,8	0,574	0,379	0,309
WS0022.B15	166-214	13,9	2,247	0,943	0,854
WS0073.H08	182-216	5,1	1,245	0,691	0,665
WS00111.K13	209-271	19,8	2,746	0,959	0,920
WS0023.B03	162-236	20,9	2,661	0,970	0,895

Na počet rozdílných alel v lokusech všech sledovaných vzorků smrku ztepilého

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 smrku ztepilého v jednotlivých lokusech

Populace	PAAC23	PAAC19	SpAGD1	WS00716.F13	WS0092.A19	WS0022.B15	WS0073.H08	WS00111.K13	WS0023.B03
SM01	10	11	22	18	7	16	6	20	18
SM02	9	24	24	18	4	17	6	21	24
SM03	9	15	20	15	3	15	5	19	21
SM04	11	15	19	21	4	13	6	17	23
SM05	13	17	20	21	3	12	5	19	22
SM06	7	17	21	16	4	12	5	19	21
SM07	10	16	19	15	3	14	5	21	26
SM08	9	17	17	16	4	11	4	18	14
SM09	13	23	23	15	4	15	6	22	21
SM10	11	14	21	17	3	14	4	22	20
SM11	10	15	19	15	3	15	4	19	19
SM12	8	15	19	15	4	13	5	21	22

Tab. 5: Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované populace smrku ztepilého

Popu- lace	SM01	SM02	SM03	SM04	SM05	SM06	SM07	SM08	SM09	SM10	SM11	SM12
N	32	59	32	30	40	30	30	24	60	30	30	30
Na	14,2	16,3	13,6	14,3	14,7	13,6	14,3	12,2	15,8	14,0	13,2	13,6
I	2,1	2,3	2,1	2,2	2,1	2,0	2,1	1,9	2,2	2,2	2,0	2,2
Privat. alely	0,66	0,22	0,33	0,44	0,33	0,00	0,33	0,11	0,22	0,44	0,22	0,00
H _o	0,68	0,82	0,69	0,76	0,72	0,65	0,74	0,72	0,79	0,73	0,67	0,8
H _e	0,78	0,83	0,78	0,81	0,78	0,76	0,77	0,74	0,81	0,8	0,77	0,81

N počet analyzovaných stromů u sledovaných populací

Na počet rozdílných alel u sledovaných populací z 9 mikrosatelitových lokusů

I Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých populací

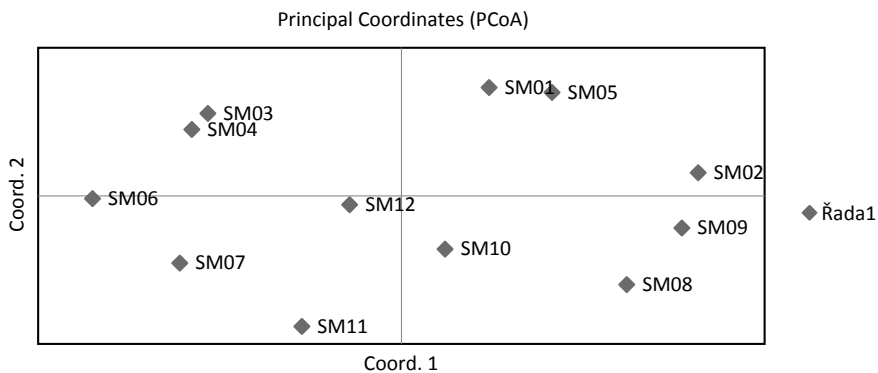
Privat. alely – počet privátních alel

H_o průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro sledované populace

H_e průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro sledované populace

Tab. 6: Fixační index (F_{ST}) – vyjadřující vzájemné genetické diferenciace mezi populacemi

Populace	SM01	SM02	SM03	SM04	SM05	SM06	SM07	SM08	SM09	SM10	SM11	SM12
SM01	0,000											
SM02	0,015	0,000										
SM03	0,010	0,019	0,000									
SM04	0,011	0,014	0,010	0,000								
SM05	0,008	0,016	0,013	0,012	0,000							
SM06	0,018	0,031	0,014	0,016	0,019	0,000						
SM07	0,016	0,022	0,011	0,013	0,016	0,013	0,000					
SM08	0,018	0,026	0,020	0,022	0,018	0,019	0,016	0,000				
SM09	0,012	0,008	0,017	0,014	0,012	0,024	0,019	0,019	0,000			
SM10	0,013	0,013	0,012	0,011	0,012	0,018	0,010	0,016	0,010	0,000		
SM11	0,018	0,022	0,016	0,015	0,020	0,018	0,011	0,017	0,015	0,012	0,000	
SM12	0,015	0,010	0,017	0,012	0,016	0,022	0,017	0,027	0,010	0,012	0,016	0,000



Obr. 3: Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací smrku ztepilého

Tab. 7: Neiovy míry vzájemných genetických vzdáleností mezi populacemi

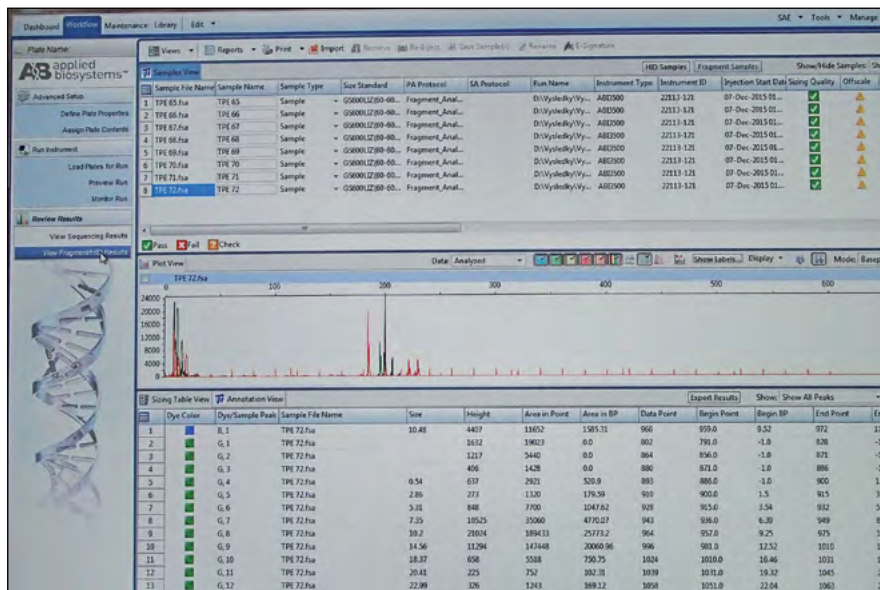
Populace	SM01	SM02	SM03	SM04	SM05	SM06	SM07	SM08	SM09	SM10	SM11	SM12
SM01	0,000											
SM02	0,113	0,000										
SM03	0,076	0,122	0,000									
SM04	0,096	0,125	0,071	0,000								
SM05	0,062	0,117	0,107	0,110	0,000							
SM06	0,116	0,166	0,089	0,091	0,123	0,000						
SM07	0,123	0,136	0,087	0,096	0,125	0,085	0,000					
SM08	0,116	0,132	0,147	0,152	0,116	0,138	0,121	0,000				
SM09	0,092	0,075	0,125	0,126	0,098	0,136	0,126	0,097	0,000			
SM10	0,104	0,095	0,100	0,103	0,103	0,110	0,073	0,100	0,084	0,000		
SM11	0,129	0,145	0,119	0,113	0,148	0,109	0,082	0,112	0,095	0,092	0,000	
SM12	0,118	0,103	0,116	0,107	0,127	0,109	0,108	0,165	0,101	0,100	0,104	0,000



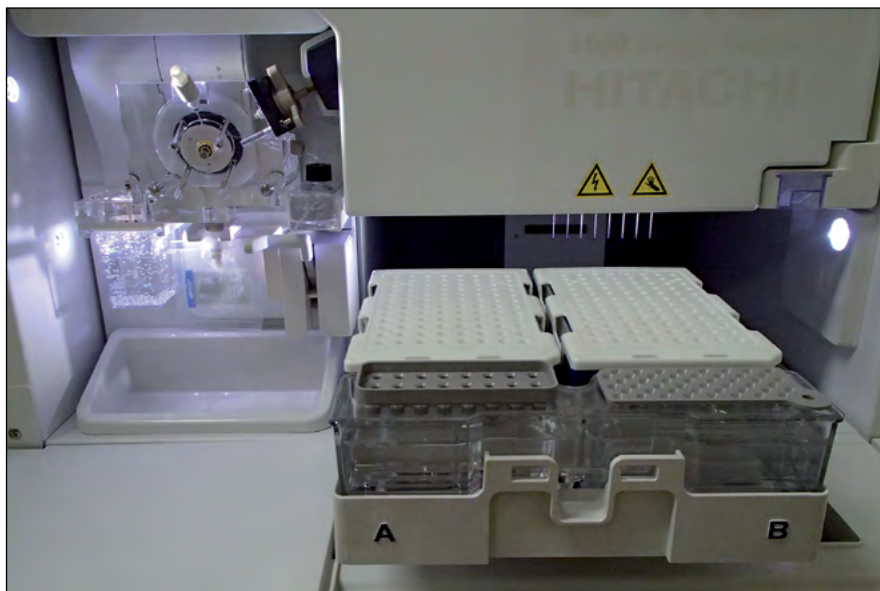
Obr. 4: Příprava vzorků pro analýzy DNA



Obr. 5: Genetický analyzátor ABI 3500



Obr. 6: Výsledek proběhlé fragmentační analýzy



Obr. 7: Vnitřní prostor genetického analyzátoru

LESNICKÝ PRŮVODCE



Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
www.vulhm.cz