

STUDIUM VARIABILITY POPULACÍ BUKU LESNÍHO POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ



Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.

Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.

Mgr. LUCIE POLÁKOVÁ

Ing. OLGA TRČKOVÁ

Ing. EVA ŽIŽKOVÁ, Ph.D.

Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů

Certifikovaná metodika

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Mgr. Lucie Poláková

Ing. Olga Trčková

Ing. Eva Žižková, Ph.D.

Strnady 2016

Lesnický průvodce 8/2016

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

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

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

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

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

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

ISBN 978-80-7417-121-5

ISSN 0862-7657

THE STUDY OF VARIABILITY OF BEECH POPULATIONS USING NUCLEAR MICROSATELLITES

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 European beech populations. 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. Thirteen important beech populations in different stands of the Czech Republic were used to develop this methodology. Twelve selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters.

Key words: simple sequence repeats, European beech populations, genetic diversity and differentiation, genetic distance, DNA analysis

Oponenti: doc. PaedDr. RNDr. Milada Švecová, CSc., Přírodovědná fakulta,
UK, Praha
Ing. Miloš Pařízek, ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové

Adresa autorek:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

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

e-mail: cvrckova@vulhm.cz
machova@vulhm.cz

Obsah:

I	CÍL METODIKY	7
II	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1	Úvod	7
2	Metodické postupy	9
a	Odběr vzorků a postupy izolace DNA	9
b	Postupy PCR amplifikace	13
c	Postupy elektroforézy v agarózovém gelu	16
d	Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů	17
e	Zpracování molekulárních dat	18
III	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	19
IV	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	20
V	EKONOMICKÉ ASPEKTY	21
VI	DEDIKACE	25
VII	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	25
VIII	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	28
	Summary	29
	Příloha	31

Zkratky použité v textu:

DNA deoxyribonukleová kyselina

nSSR nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je představit postupy analýz DNA s využitím jaderných mikrosatelitových lokusů pro získání poznatků o genetických charakteristikách, především genetické diverzitě, heterozygotnosti, diferenciaci a genetických vzdálenostech populací buku lesního.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

Buk lesní *Fagus sylvatica* L. je z ekologického i ekonomického pohledu nejvýznamnější hospodářskou listnatou dřevinou rostoucí na území ČR. Je to dřevina evropského areálu s těžištěm rozšíření v západní, střední a jihovýchodní části kontinentu. Celé naše území leží uvnitř areálu rozšíření buku, a proto tuto dřevinu nalezneme ve všech středohořích a horských oblastech hercynské i karpatské části našeho státu. V nadmořských výškách 400–800 m často vytváří nesmíšené porosty, na spodní hranici rozšíření se často mísí s dubem a na horní se smrkem a jedlí (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Je to druh dřeviny jednodomý, diploidní ($2n=24$), větrosnubný a z hlediska sukcese se řadí k druhům klimaxového společenstva (ODDOU-MURATORIO et al. 2011). Výraznější úbytek bukových porostů započal již ve středověku, kdy se buk začal hojně využívat jako palivo, zejména pro rozvíjející se řemeslnou výrobu. Později byly bučiny nahrazovány jehličnatými porosty z důvodu orientace na užitkové dříví. V polovině 20. století se v Čechách začaly bukové porosty uměle obnovovat, ale s využitím semena i z karpatské bukové oblasti bez předchozího vyzkoušení jejich vhodnosti (SVOBODA 1955). Podle Zprávy o stavu lesa a lesního hospodářství v roce 2014 (Ministerstvo zemědělství ČR 2015) je v současnosti snahou lesníků dosáhnout optimální druhové skladby lesů, což také znamená podstatně zvýšit zastoupení buku lesního. Pro návrat tohoto druhu do lesů ve větším měřítku je důležité získat podrobnější znalosti o genetické struktuře populací. Buk lesní je v Evropě jednou z nejvíce geneticky zkoumaných dřevin, a to s využitím analýz různých markerů: izoenzymových (GÖMÖRY et al. 1998; KONNERT et al. 2000; COMPS et al. 2001; DOUNAVI et al. 2010), chloroplastové DNA (VETTORI et al. 2004), AFLP (SCALFI 2004; JUMP,

PEÑUELAS 2007), SNP (SEIFERT et al. 2012), mikrosatelitů (PASTORELLI et al. 2003; ASUKA et al. 2004; VORNAM et al. 2004; HASENKAMP et al. 2011; LEFÈVRE et al. 2012; PLUESS et al. 2013). Analýzy DNA umožňují studovat proměnlivost přímo v dědičné informaci organismů, která není na rozdíl od fenotypových projevů ovlivněna změnami vnějšího prostředí. Vyhledávají se DNA markery (lišící se úseky DNA), které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí nebo měnící se délce specifických úseků DNA. Aby se získaly ze zkoumaných vzorků optimální informace o genetické proměnlivosti, je potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Mikrosatelitové markery s jejich vysokým stupněm polymorfismu jsou ideálním nástrojem pro studium toků genů, genové mapování, identifikaci jedinců, určení rodičovství apod. (PFEIFFER et al. 1997; PASTORELLI et al. 2003; CHRISTIAKOV et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2006). Tyto markery se skládají z mnohokrát se opakujících krátkých motivů nukleotidů zpravidla 2–5 báze dlouhých (SCHMIDT, HESLOP – HARRISON 1996), kdy polymorfismus je dán rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů. Pro ověřování polymorfismu vybraných populací buku lesního byly zvoleny jaderné mikrosatelity – nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery. Jejich kodominantní charakter umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů a poskytnout významné informace o populační dynamice, prostorové genetické struktuře a rozdělení genetické diverzity (LEFÈVRE et al. 2012). Zkoumaný mikrosatelitový lokus bývá obvykle dlouhý sto až tři sta bází. Abychom ho mohli detegovat mezi miliardami ostatních nukleotidů deoxyribonukleotidové kyseliny, musíme vytvořit miliony kopií této informace. Amplifikace probíhá procesem polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery (krátké oligonukleotidy 20–30 bp), které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. PCR je třístupňový proces opakovaný v několika cyklech. Tyto stupně zahrnují denaturaci, při které jsou obvykle při 94 °C obě vlákna DNA od sebe oddělena, přichycení primerů (annealing) při teplotě mezi 50–60 °C k oběma jednotlivým vláknům DNA podle komplementarity nukleotidů a prodlužování řetězce při teplotě 72 °C, kdy termostabilní polymeráza přidává k vláknům s přichyceným primerem podle komplementarity nukleotidy dodané v reakční směsi. Nové DNA sekvence slouží jako předloha pro další cykly PCR, která se provádí v automatizovaných teplotních cyklovacích.

Účelem zde zpracovaných metodických postupů bylo vybrat vhodné polymorfní mikrosatelitové markery a optimalizovat postupy polymerázové řetězové reakce (PCR) pro získání jednotlivých reprodukovatelných amplifikátů a po statistickém zpracování velikostí alel získat genetické charakteristiky šetřených populací. Z důvodu časových a finančních úspor při provádění DNA analýz zejména u velkých souborů vzorků byly také postupy získávání PCR produktů a hodnocení jejich velikostí při fragmentační analýze zaměřeny na seskupování vybraných mikrosatelitových lokusů do multiplexů, kdy probíhají amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou.

Ověřené poznatky o genetické diverzitě by měly přispět k zachování biologické rozmanitosti lesních ekosystémů a prosazování zásad trvale udržitelného obhospodařování, což je jedním z prioritních úkolů státní lesnické politiky. Vzhledem k převažující umělé obnově lesa je zajištění kvality zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin základním předpokladem pro budoucí výnos, adaptační schopnosti a ekologickou stabilitu lesa. Prognóza dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě stanovení jejich genetické diverzity. Dostatečně vysoká hladina genetické diverzity u lesních dřevin je také zárukou zachování adaptačního potenciálu pro budoucí generace, jako nutné podmínky pro přežití těchto dlouhověkých organismů, a to zejména s ohledem na v současné době měnící se klimatické podmínky prostředí (VORNAM et al. 2004). I z důvodu výrazného snížení výskytu bukových porostů v minulosti, a tím redukování genetické informace, je nutné genetické prověření obnovených populací ať už umělou výsadbou nebo přirozenou obnovou. Postupy DNA analýz předložené v této metodice byly ověřeny na 13 vybraných významných bukových populacích v ČR, rostoucích především v genových základnách; u těchto populací byly zjištěny vyšší hodnoty diverzity a významné rozdíly v alelických frekvencích mikrosatelitových lokusů. Metodika popisuje odběr a zpracování rostlinného materiálu, získání elutátů DNA, amplifikaci mikrosatelitových lokusů, odečtení velikostí alel a jejich statistické zhodnocení.

2 Metodické postupy

a Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Nejvhodnější období pro odběr rostlinného materiálu je jaro, kdy lze odebírat pupeny nebo mladé listy. Izolace ze starších listů z důvodu vyššího obsahu fenolických látek, polysacharidů a voskového povrchu listů snižuje kvalitu i kvantitu vyizolované DNA, což může značně zkomplikovat průběh navazující PCR amplifikace. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se při odběru označí, uloží do mikrotenového sáčku a udržují při nízké teplotě (např. pomocí chladové tašky s mrazíci destičkami) a co nejrychleji se přepraví ke zpracování v laboratoři. Vzhledem k následným analýzám je důležité vzorky držet stále při nízké teplotě. Vzhledem k výnosům a kvalitě je nejlépe deoxyribonukleovou kyselinu izolovat okamžitě z čerstvě odebraných vzorků. V případě,

že izolace DNA není provedena ihned, 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 s využitím lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít v nádobách (např. lze použít plastové flakony, 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 na našem pracovišti nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Touto metodou lze v poměrně krátkém časovém úseku získat kvalitní eluáty DNA. Izolace DNA ze starších listů buků byla s dostatečným výsledkem získání kvalitní DNA provedena s využitím soupravy PowerPlant[®] Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.), jehož součástí je roztok na separaci fenolických látek.

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

Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátním pufrům AW1 a AW2. V případě výskytu sraženin v pufrech AP1 a AW1 se roztoky pro odstranění sraženin nahřejí. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na 65 °C, aby byla připravena pro 2. krok pracovního postupu.

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg; rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například použitím tekutého dusíku aplikovaného na rostlinný materiál v třecích miskách. Rozdrcený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RnazyA, 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 otáček za minutu (rpm).
4. Vzniklý lysát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm.
5. Přefiltrovaná frakce se s odečtením získaného objemu přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Dáváme pozor, abychom nenabrali příliš pelet.

6. Přidá se pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5 násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasátím a vypuštěním z mikropipety vzniklou směs promícháme.
7. Odpipetuje se 650 ml směsi a přemístí do Dneasy Mini spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. Dneasy Mini spin kolonka se umístí do nové 2ml zkumavky, přidá se 500 ml pufru AW2 a centrifuguje se 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidá se dalších 500 ml pufru AW2 a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně Dneasy Mini spin kolonku ze zkumavky, tak abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidá se 100 ml AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifuguje 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm.
12. Opakuje se krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím PowerPlant[®] Pro DNA Isolation Kitu

1. Rostlinný materiál 50 mg čerstvé hmotnosti se zhomogenizuje ve třecí misce s tekutým dusíkem a přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. K rozetřenému vzorku se napipetuje 450 ml roztoku PD1 a následně 50 ml roztoku PD2 a 3 ml RNázyA. Za použití stolního vortexu se vzorek důkladně promíchá a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
2. Vzniklý lyzát se opatrně, aby nebyl nabrán pelet, přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a napipetuje se k němu 175 ml roztoku PD3.

Směs se promíchá opakovaným nasátím a vypuštěním mikropipety, dále se inkubuje 5 minut při teplotě 4 °C a centrifuguje 2 minuty při 14 000 rpm.

3. Kapalná frakce se opatrně přepipetuje bez narušení peletu do nové 2ml mikrocentrifugační zkumavky a napipetuje se k ní 600 ml roztoku PD4 a 600 ml roztoku PD6. Směs se 5 sekund promíchává pomocí stolního vortexu. Pak se 600 ml z této směsi přenese na Spin Filter kolonu posazenou ve zkumavce (collection tube) a centrifuguje 30 sekund při 10 000 rpm. Přefiltrovanou kapalinu odstraníme a vrátíme Spin Filter kolonu do zkumavky. Napipetuje se dalších 600 ml směsi na Spin Filter kolonu a centrifuguje při stejné rychlosti, filtrace se popřípadě opakuje až do vyčerpání celé směsi.
4. Následně se napipetuje 500 ml roztoku PD5 na Spin Filter kolonu a směs se centrifuguje 30 sekund při 10 000 rpm. Odstraníme přefiltrovanou kapalinu a vrátíme Spin Filter kolonu do zkumavky.
5. Napipetuje se 500 ml roztoku PD6 na Spin Filter kolonu a směs se centrifuguje 30 sekund při 10 000 rpm. Odstraníme přefiltrovanou kapalinu a vrátíme Spin Filter kolonu do zkumavky. Pro dostatečné vysušení membránového filtru kolony je vhodné centrifugaci zopakovat s delším časovým intervalem a vyšší rychlostí (2 min/14 000 rpm).
6. Kolonky se opatrně přemístí do nových 2ml mikrocentrifugačních zkumavek. Do středu membránového filtru se napipetuje 100 ml elučního roztoku PD7. Nechá se inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě a poté centrifuguje 30 sekund při 10 000 rpm pro získání eluátu DNA.

Požadované přístrojové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladič blok na mikro-zkumavky (-20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozskumavky 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) spektrofotometricky např. přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA se nejčastěji pohybovaly v rozmezí 10–50 ng/μl. Hodnoty optimální čistoty by se měly pohybovat v rozmezí 1,7–1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších látek (proteinů, fenolických látek). Čistota a koncentrace eluátů DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. Vzorky DNA s vyšší koncentrací je vhodné pro PCR reakce naředit na hodnotu cca 20 ng/μl. Pro delší uchování je nutné eluáty DNA uložit minimálně do -20 °C, pro dlouhodobé uchování (v řadách několika let) do -80 °C.

b Postupy PCR amplifikace

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) – jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo vybráno 12 polymorfních mikrosatelitových lokusů poskytujících jednotlivé reprodukovatelné amplifikáty v očekávané velikosti. Markery FS1-03, FS1-11, FS1-15, FS4-46 byly vybrány z publikace PASTORELLI et al. (2003), marker sfc0036 z publikace ASUKA et al. (2004). Markery mfc 5, mfc 7, mfc 11 byly vybrány z článku VORNAM et al. (2004), marker csolfagus-31 z publikace LEFÈVRE et al. (2012) a markery Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, Fagsyl-002929 z publikace PLUESS et al. (2013), viz Tab. 1. Pro získá-

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokusy	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
mfc 5	F: ACT GGG ACA AAA AAA CAA AA R: GAA GGA CCA AGG CAC ATA AA	277–321
mfc 7	F: AAA ATA CAC TGC CCC AAA A R: CAG GTT TTG GTT TCT TAC AC	100–128
mfc 11	F: GTCAACCAACTT F: ACA GAT AAA AAC AGA AGC CA R: TTT GGT TTT GTT GAG TTT AG	310–330
FS1-03	F: CAC AGC TTG ACA CAT TCC AAC R: TGG TAA AGC ACT TTT TCC CAC T	76–126
FS1-11	F: TGA ATT CAA TCA TTT GAC CAT TC R: GGA AGG GTG CTT CAA TTT GG	90–120
FS1-15	F: TCA AAC CCA GTA AAT TTC TCA R: GCC TCA ATG AAC TCA AAA AC	92–136
FS4-46	F: GCA GTC CTC CAC CAT TAC TA R: TAC AAC AGC AGG CTA TCC AT	213–372
Fagsyl-000905	F: GAT CAT AGC GCC GGA ATT GG R: GGT CCT CCT CCT GGT ACA AC	146–168
Fagsyl-001018	F: CGA GAT GGA CTT CTA AGT TTT ATT TGC R: CGA GAT GGA CTT CTA AGT TTT ATT TGC	96–120
Fagsyl-002929	F: GCG GCG ACT GGA ATA ATA GC R: CAA TCA CAC GCT GCA CAA AC	143–200
csolfagus-31	F: TCT ATT GAC ACA AGA ATA AGA ACA CC R: CTT GGC AAG AAA AGG GGA TT	106–128
sfc0036	F: CAT GCT TGA CTG ACT GTA AGT TC R: TCC AGG CCT AAA AAC ATT TAT AG	98–114

ní amplifikačních produktů těchto lokusů byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány dále uváděné protokoly. PCR s vybranými 12 lokusy byly sestaveny do tří multiplexů a byly pořízeny fluorescenčně značené primery. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce, DNA polymerázu je nutné stále uchovávat při -20 °C; dáváme ji proto do směsi nakonec přímo z mrazicího boxu.

Protokoly PCR:

Multiplex 1 - názvy SSR lokusů, fluorescenční označení jejich forward primerů:

mfc 11 (NED), FS1-03 (NED), FS1-15 (VIC), Fagsyl-001018 (6-FAM)

Multiplex 2 - názvy SSR lokusů, fluorescenční označení jejich forward primerů:

FS1-11 (NED), mfc 7 (VIC), csolfagus-31 (PET), sfc0036 (6-FAM)

Multiplex 3 - názvy SSR lokusů, fluorescenční označení jejich forward primerů:

Fagsyl-002929 (VIC), Fagsyl-000905 (PET), FS4-46 (NED), mfc 5 (6-FAM)

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). Pro jednotlivé multiplexy připravíme směs z primerů v 2 µM koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl, napipetujeme ze zásobních 100 µM roztoků forward i revers primerů po 2 µl a doplníme 84 µl TE pufru do celkového objemu 100 µl).

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.

Složení reakční směsi a teplotní režim PCR jsou stejné u všech tří multiplexů.

Optimalizovaný protokol PCR

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50mM MgCl ₂	0,6 µl
10mM dNTPs (2,5mM each)	0,1 µl
Primers mix	0,75 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	
celkem	15 µl

Reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem Invitrogen (Life Technologies).

Teplotní režim PCR

Počet cyklů	Teplota	Čas	Popis
1	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
35	94 °C	45 sec	Denaturace
35	58 °C	45 sec	Annealing
35	72 °C	55 sec	Elongace
1	72 °C	15 min	Finální elongace
1	4 °C	úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

c Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v $0,5 \times$ TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo GelRed (GelRedTMNucleic acid Gel Stain, 10,000 XinWater, Biotium, Hayward). GelRed se přidává do zahřátého agarózového roztoku v poměru 1 : 10 000 a gel se ihned rozlévá do příslušné formy ve výšce vrstvy asi 1 cm. 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 μ l) smíchané s 4 μ l pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich). Pro možnost zjištění orientačních velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 μ l standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 μ l destilované vody a 2 μ l pufru (gel loading buffer).

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

Požadované přístrojové 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 6-FAM, VIC, NED, PET). PCR amplifikáty (většinou postačuje 1 μ 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 μ l na jeden vzorek a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystem) 0,4 μ 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 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 každému vzorku, 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

Buk lesní má diploidní sadu chromozomů ($2n=24$). U sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě stejné hodnoty alel v případě homozygota, nebo v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Pro získání genetických charakteristik se velikosti alel z hodnocených lokusů pro sledované populace statisticky zpracovávají (např. za využití statistických programů GenALEX 6.501 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), 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, heterozygotnosti 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 lokusů u jedinců příslušných klonů na základě vypracovaného přehledu hodnot alel zvolených lokusů pro šetřené klony.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodické postupy získání genetických charakteristik včetně stanovení genetické diverzity populací buku lesního rostoucích na území České republiky pomocí jaderných mikrosatelitových markerů nebyly dosud popsány. Pro vývoj metodiky byly testovány mikrosatelitové markery, které vyvinuly zahraniční autoři. Za účelem optimalizace amplifikačních podmínek byly testovány různé koncentrace reakčních složek (především koncentrace primerů) a reakční teploty. Pro analýzy velkých souborů (populací) byly postupy analýz DNA také zaměřeny na seskupování vybraných mikrosatelitových lokusů do multiplexů, kdy probíhají amplifikace a fragmentační analýzy několika lokusů najednou. Buk lesní jako významná evropská dřevina byl u řady zahraničních autorů předmětem genetických studií s využitím mikrosatelitových markerů (PASTORELLI et al. 2003; ASUKA et al. 2004; VORNAM et al. 2004; BUIVEVED et al. 2007; CHYBICKI et al. 2009; HASENKAMP et al. 2011; LEFÈVRE et al. 2012; PLUESS et al. 2013). Doposud získané poznatky o proměnlivosti bukových porostů na území ČR vycházely převážně z hodnocení provenienčních ploch pomocí fenotypového šetření. Z molekulárně genetických metod byly v minulosti pro buk lesní na území ČR použity pouze izoenzymové analýzy (GÖMÖRY et al. 1998).

Pro získání informací o genetické proměnlivosti buku lesního bylo potřebné vyhledat DNA markery, které vykazují vysoký polymorfismus. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se liší v počtu opakování základního motivu nukleotidů. S využitím automatického sekvenátoru získáme vynikající rozlišení alel, například lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačního produktu o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Pro analýzy byly vybrány jaderné mikrosatelity FS1-03, FS1-11, FS1-15, FS4-46, sfc0036, mfc 5, mfc 7, mfc 11, csolfagus-31, Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, Fagsyl-002929, jejichž PCR amplifikace byly optimalizovány i za účelem seskupení jejich analýz do tří multiplexů po 4 lokusech. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu.

IV POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vypracována za účelem zjišťování genetických charakteristik především genetické diverzity, heterozygotnosti, diferenciace a genetických vzdáleností populací buku lesního.

Pro vypracování a ověření metodiky byli využiti dospělí jedinci významných populací, rostoucí převážně v genových základnách různých přírodních lesních oblastí České republiky, kteří reprezentují cenné regionální populace tohoto druhu.

Genetická rozmanitost populací je podstatná pro přežití jejich zástupců a přizpůsobení se změnám životních podmínek na stanovišti. Proto prognóza dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě zjištění genetické struktury. Znalost úrovně genetické diverzity, diferenciace, heterozygotnosti a ostatních genetických charakteristik populací, které se využívají nebo plánují využívat jako zdroj reprodukčního materiálu, je významná k efektivnějšímu využívání stávajících genetických zdrojů pro zkvalitňování genetické struktury populací a k zachování biodiverzity. Povinnost zachovávat a reprodukovat genetické zdroje lesních dřevin vyplývá mimo jiné z mezinárodních závazků ČR, přijetí Úmluvy o biologické rozmanitosti dne 5. června 1992 v Rio de Janeiro a naplnění závěrů ministerských konferencí o ochraně lesů Forest Europe (Štrasburk 1990, Helsinky 1993, Lisabon 1998, Vídeň 2003, Varšava 2007, Oslo 2011 a Madrid 2015). Ochrana biologické rozmanitosti představuje také naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012–2020 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky schválené usnesením vlády ČR č. 620 ze dne 25. května 2005.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Vybrané lokusy prokázaly dostatečný polymorfismus pro zjištění genetických rozdílů mezi jedinci, populacemi a klony. V příloze jsou uvedeny příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací buku lesního. Reprodukovatelnost této metody potvrzují shodné výsledky při opakovaných analýzách sledovaných lokusů a zkušenosti i jiných laboratoří, např. ASP – Bavarian Office for Forest Seeding and Planting, Teisendorf, Institute of Biosciences and BioResources National Research Council, Florencie, BFW Department of Genetics molecular laboratory Vídeň při využití metody mikrosatelitových lokusů. Ověření zde předkládaných metodických postupů proběhlo také v rámci navázané spolupráce s polským výzkumným institutem (Genetics Department Institute of Experimental Biology, Faculty of Natural Science, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz), kam byly poslány vzorky DNA

našich buků a provedeny analýzy některých stejných lokusů. Na polském pracovišti byly získány totožné výsledky velikostí alel jako v naší laboratoři.

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).

Metodické postupy vedoucí ke zjištění hodnot genetických charakteristik především genetické diverzity populací buku lesního budou sloužit pro potřeby státní správy v oblasti lesního a vodního hospodářství (MZe, MŽP) a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (Ústav pro hospodářskou úpravu lesů – ÚHÚL), přičemž se předpokládá uplatnění získaných znalostí o geneticky podmíněné proměnlivosti jako podkladů pro aktualizaci souvisejících legislativních předpisů týkajících se ochrany genofondu lesních dřevin, podkladů pro aktualizace Oblastních plánů rozvoje lesa, podkladů pro vyhlásování genových základen a pro aktualizaci právních předpisů a norem souvisejících zejména s upřesňováním doporučených pravidel přenosů reprodukčního materiálu lesních dřevin.

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. Současné dochází i k naplňování cílů Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin – podporovat kvalitní genetické zdroje a ověřovat jejich genetickou strukturu metodou DNA markerů. Reprodukce genově bohatších populací zaručuje získání stabilnějších a odolnějších porostů, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat možným změnám klimatu, a tím přispívat k ochraně životního prostředí. Při posuzování ekonomických aspektů nelze opomenout, že ochrana biologické rozmanitosti představuje také naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012–2020 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky schválené usnesením vlády ČR č. 620 ze dne 25. května 2005. Vedle celospolečenských přínosů se dá reálně předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů bukových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

Buk lesní je v našich podmínkách z hlediska svého hospodářského uplatnění důležitý druh dřeviny, který významným způsobem ovlivňuje ekonomiku řady lesních majetků všech forem vlastnictví, a tedy i celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-děvařského sektoru) a z hlediska dalších aspektů lesnického hospodaření má značný potenciál do budoucna pro zvýšení stability, vitality a diverzity lesních porostů.

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že bude v době mýtní zralosti lesních porostů dosaženo současně i vyšší objemové produkce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýti u bukových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ), oproti ostatním bukovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu činí v objemovém vyjádření cca 91 m³/ha a jednoznačně reprezentuje lepší produkční bázi v genových základnách.

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

Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná cena surového dříví za ČR, která reprezentuje cenu dřeva na pni, tj. cenu surového dříví na odvozním místě po odečtení těžebních nákladů, a která je každoročně zveřejňována ve Věstníku MZe, odráží značnou měrou i dominantní pozici dřeviny smrk na trhu se surovým dřívím, nebylo v případě kalkulací u buku metodicky zcela odůvodněné použití této průměrné ceny surového dříví k ekonomickým výpočtům, protože by došlo k nadhodnocení výsledků. Z tohoto důvodu byla kalkulace ekonomického přínosu u buku ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví konstruována na základě:

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

Při dlouhodobě dosahovaném celostátním průměrném podílu sortimentů surového dříví v dodávkách listnatého dříví (pilařská kulatina 33 %, vlákna a ostatní průmyslové dříví 27 % a palivového dříví 40 %) a při ceně surového dříví za 2. čtvrtletí 2016 ve výši 1 623 Kč/m³ za pilařskou kulatinu III. tř. jakosti A/B, 1 147 Kč/m³ za dříví V. tř. jakosti pro výrobu buničiny a 1 145 Kč/m³ za palivové dříví, činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších bukových porostů v GZ v době obmýti

částku 119 300 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 38 700 Kč/ha (průměrné celostátní náklady činí 423 Kč/m³) pak představuje zvýšený čistý výnos ve výši 80 600 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob bukových porostů. Vypočtený výsledný ekonomický efekt (zvýšený čistý výnos) ze smýceného lesního porostu v době obmýti však můžeme označit za pesimistickou variantu výpočtu.

Při optimistické variantě výpočtu, pokud budeme vycházet z reálné situace na řadě lesních majetků, kdy v závislosti na kvalitě těžebního fondu lze dosáhnout i vyšších podílů pilářské kulatiny v dodávkách surového dříví než je celostátní průměr, tj. více než 33 %, a při současném použití těžebních nákladů v místě a čase obvyklých, odpovídajících nižším nákladům vztaženým jen k těžbě mytné zralých listnatých porostů, by se výsledný ekonomický efekt ještě výrazněji projevil ve vyšším hospodářském výsledku (zisku) vlastníků lesa. Dále, vyšší celková objemová produkce porostů z kvalitních genetických zdrojů se neprojeví v ekonomice vlastníků lesa pouze v době obmýti, ale již také v rámci výchovných opatření v podobě zlepšení (zvýšení) cash flows z provedených probírek, což rovněž pozitivně ovlivní ekonomickou situaci vlastníků lesa a přispěje k podpoře ekonomického pilíře trvale udržitelného hospodaření v lese.

Je nutno rovněž připomenout, že provedená kalkulace se zabývá pouze oceněním změny v kvantitativních parametrech (v objemu). Jen z důvodu současné neznalosti řady potřebných ekonomických veličin nejsou do výpočtů zařazeny také další do-datečné ekonomické efekty vyplývající z lepších kvalitativních parametrů porostů, které by se projevil např. v lepší sortimentaci těžebního fondu a v následném vyšším zpeněžení surového dříví.

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

- Analýza datového skladu ÚHÚL – DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2016)
- Lesnictví 2015, katalog produktů, dodávky listnatého dříví za období 2006-2015, tabulka č. 2.13, Český statistický úřad, Praha, 2016
- Indexy cen v lesnictví (surové dříví) – 2. čtvrtletí 2016, průměrné ceny surového dříví pro tuzemsko za ČR v roce 2016 (Kč/m³), tabulka 4 – vlastníci, Český statistický úřad, Praha, 2016
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2014, Ministerstvo zemědělství, Praha 2015, ISBN 978-80-7434-242-4

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

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

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem přístrojového laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jednoho stromu jsou průměrné náklady 106,- Kč, náklady u jednoho vzorku na PCR produkt a následnou fragmentační analýzu, což představuje dle uvedených optimalizovaných postupů v jednom multiplexu analýzu současně 4 lokusů, činí 61,- Kč vč. DPH. V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. Tedy cena analýzy 12 mikrosatelitových lokusů (získaných postupy tří multiplexů) pro jeden vzorek (strom) je 183,- Kč včetně DPH, s náklady na izolaci DNA to činí celkem 289,- Kč. Při využití služeb komerčních laboratoří jsme při průzkumu na tuzemském trhu zjistili výhodné cenové nabídky od firmy SEQme. Předpokládaná cena na analýzu jednoho vzorku je 242,- Kč včetně DPH a zahrnuje PCR amplifikaci a fragmentační analýzu jednoho multiplexu. Tato cena je kalkulována při vlastním dodání vysoce kvalitní DNA a vypracovaných metodických postupů (nebude nutno dopracovávat jakékoliv optimalizace PCR). Na postupy optimalizace PCR komerční firmy nevedou ceníky, např. firma SEQme si tyto práce účtuje hodinovou sazbou a to 1 500,- Kč bez DPH/hod. Fragmentační analýza při dodání vlastních PCR amplifikátů v destičce vychází na 72,- Kč pro jeden vzorek (z 1 stromu 1 multiplex).

VI DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0116 (č.j. 10462/2016-MZE-17011) z 20 % a výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QJ1230334 z 80 %.

Podíly práce autorů na vypracování metodiky:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D. 30 %, Ing. Pavlína Máchová, Ph.D. 20 %, Mgr. Lucie Poláková 20 %, Ing. Olga Trčková 20 %, Ing. Eva Žižková, Ph.D. 10 %

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ASUKA Y., TANI N., TSUMURA Y., TOMARU N. 2004: Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes*, 4: 101–103.
- BUI TEVELD J., VENDRAMIN G.G., LEONARDI S., KAMER K., GEBUREK T. 2007: Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history. *Forest Ecology and Management*, 247: 98–106.
- COMPS B., GÖMÖRY D., LETOUZY J., THIÉBAUT B., PETIT R.J. 2001: Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics*, 157: 389–397.
- DOUNAVI A., KOUTSIAS N., ZIEHE M., HATTEMER H.H. 2010: Spatial patterns and genetic structures within beech populations (*Fagus sylvatica* L.) of forked and non-forked individuals. *European Journal of Forest Research*, 129: 1191–1202.
- GÖMÖRY D., HYNEK V., PAULE L. 1998: Delineation of seed zones for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Czech Republic based on isozyme gene markers. *Annals of Forest Science*, 55: 425–436.

- HASENKAMP N., ZIEGENHAGEN B., MENGEL C., SCHULZE L., SCHMITT H.-P., LIEPELT S. 2011: Towards a DNA marker assisted seed source identification: a pilot study in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Research*, 130: 513–519.
- 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.
- CHYBICKI I.J., TROJANKIEWICZ M., OLEKSA A., DZIALUK A., BURCZYK J. 2009: Isolation-by-distance within naturally established populations of European beech (*Fagus sylvatica*). *Botany*, 87: 791–798.
- 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., ZIEHE M., TROBER U., MAUER W., JANSSEN A., SANDER T., HUSSENDÖRFER E., HERTEL H. 2000: Genetische Variation der Buch (*Fagus sylvatica* L.) in Deutschland: Gemeinsame Auswertung genetischer Inventuren über verschiedene Bundesländer. *Forts und Holz*, 55: 403–408.
- LEFÈVRE S., WAGNER S., PETIT R.J., DE LAFONTAINE G. 2012: Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. *Molecular Ecology Resources*, 12: 484–491.
- NEI M. 1972: Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- JUMP A.S., PEÑUELAS J. 2007: Extensive spatial genetic structure revealed by AFLP but not SSR molecular markers in the wind-pollinated tree, *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, 16: 925–936.
- ODDOU–MURATORIO S., KLEIN E.K., VENDRAMIN G.G., FADY B. 2011: Spatial vs. temporal effects on demographic and genetic structures: the roles of dispersal, mast seeding and differential mortality on patterns of recruitment in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, 20: 1997–2010.
- 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.
- PASTORELLI R., SMULDERS M.J.M., VAN’T WESTENDE W.P.C., VOSMAN B., GIANNINI R., VETTORI C., VENDRAMIN G.G. 2003: Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology*, 3: 76–78.

- 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.
- PLUESS A.R., MÄÄTTÄNEN K. 2013: Characterization of eighteen novel microsatellite markers and multiplex PCR protocol for *Fagus sylvatica*. *Conservation Genetics Resources*, 5: 311–314.
- SCALFI M., TROGGIO M., PIOVANI P., LEONARDI S., MAGNASCHI G., VENDRAMIN G.G., MENOZZI P. 2004: A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 433–441.
- SEIFERT S., VORNAM B., FINKELDEY R. 2012: DNA sequence variation and development of SNP markers in beech (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Research*, 131: 1761–1770.
- 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.
- SVOBODA P. 1955: Lesní dřeviny a jejich porosty. Část II [Forest tree species and their stands. Part II]. Prague, Státní zemědělské nakladatelství v Praze: 573.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009: Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- VAN OOSTERHOUT C.V., HUTCHINSON W.F., WILLS D.P.M., SHIPLEY P. 2004: Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4: 535–538.
- VETTORI C., VENDRAMIN G.G., ANZIDEI M., PASTORELLI R., PAFFETTI D., GIANNINI R. 2004: Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1–9.
- VORNAM B., DECARLI N., GAILING O. 2004: Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 5: 561–570.
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky roce 2014. Ministerstvo zemědělství ČR, rok vydání 2015.

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

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

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

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

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

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

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

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

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

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O.: Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. Journal of Forest Science, 88/2016 (v tisku).

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

THE STUDY OF VARIABILITY OF BEECH POPULATIONS USING NUCLEAR MICROSATELLITES

Summary

Fagus sylvatica L. (European beech) is ecologically and economically the most important broadleaved tree in the Czech Republic, where conditions for its growth are favourable. It is a woody species of the European area with focus of distribution in the western, central and south-eastern parts of the continent. The Czech Republic is located within that area, so this tree species grows throughout the Central Highlands and at the Hercynian and Carpathian mountainous regions of the country (ÚRADNÍČEK et al. 2009). The devastation of beech stands began in the Middle Ages due to the extensive use of this species as fuel, and in the 19th century there occurred a strong decline in European beech cultivation as a consequence of artificial reforestation and silvicultural preferences for conifers. The dissemination of beech began again in the mid-20th century, but seeds from the Carpathian region were used for reforestation without testing the suitability of these provenances (SVOBODA 1955). Recently, the main coniferous area, such as of spruce, pine and larch, has gradually decreased in the Czech Republic, while growing proportions of silver fir and such deciduous trees as European beech have been planted in order to achieve optimal species composition of forests (Ministry of Agriculture of the Czech Republic 2015).

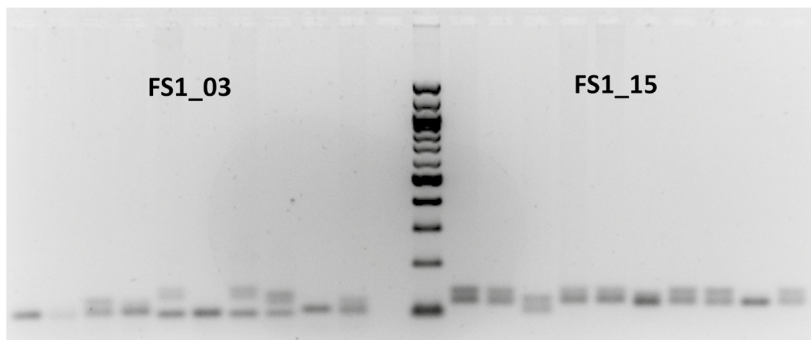
In order to reintroduce this species in larger proportions, it is important to acquire more detailed knowledge about the dynamics of genetic diversity within and among beech populations. This methodology presents the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for genetic characterization of beech populations. Nuclear microsatellites, also known as nuclear simple sequence repeats (nSSR) are small repetitive DNA sequences providing important information about population dynamics, spatial genetic structure, and distribution of genetic diversity (LEFÈVRE et al. 2012). Nuclear microsatellites are highly polymorphic, selectively neutral and codominant markers that enable to differentiate homozygotes from heterozygotes.

This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products and calculations of molecular data. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) from 100 mg fresh or 20 mg lyophilized young leaves or buds. PowerPlant[®] Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) was used for isolation of DNA from older leaves.

The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Thirteen important naturally regenerated European beech populations growing mostly in gene reserves of different stands in the Czech Republic were used to develop this methodology. Clear, reproducible PCR products were produced for twelve microsatellite markers: mfc 5, mfc 7, mfc 11 (VORNAM et al. 2004), FS1-03, FS1-11, FS1-15, FS4-46 (PASTORELLI et al. 2003), Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, Fagsyl-002929 (PLUESS et al. 2013), csolfagus-31 (LEFÈVRE et al. 2012), sfc0036 (ASUKA et al. 2004), so they proved suitable for finding genetic parameters. The identified loci were verified as highly polymorphic and could be used as markers for the next genetic analyses of European beech populations. Given the prevailing artificial reforestation, knowledge based on DNA analyses regarding the variability of genetic resources will contribute to the quality of the reproduction material and to creating optimal species composition in forests.

Příloha

Příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací buku lesního



Obr. 1: Příklad PCR amplifikátů na gelovém nosiči získaných s primery k lokusům FS1-03 a FS1-15



Obr. 2: Příklad fragmentační analýzy (záznam z genetického analyzátoru, alely lokusu mfc 5 u tří jedinců buku lesního)

Tab. 2: Genetické charakteristiky vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů ze 390 sledovaných stromů buku lesního

Lokusy	Sekvence primerů (5'–3')	Velikost PCR produktů (bp)	N_a	I	H_o	H_e
mfc 5	F: ACT GGG ACA AAA AAA CAA AA R: GAA GGA CCA AGG CAC ATA AA	277–321	22	2,40	0,62	0,88
mfc 7	F: AAA ATA CAC TGC CCC AAA A R: CAG GTT TTG GTT TCT TAC AC	100–128	13	1,25	0,63	0,61
mfc 11	F: ACA GAT AAA AAC AGA AGC CA R: TTT GGT TTT GTT GAG TTT AG	310–330	11	1,49	0,41	0,67
FS1-03	F: CAC AGC TTG ACA CAT TCC AAC R: TGG TAA AGC ACT TTT TCC CAC T	76–126	23	1,76	0,63	0,72
FS1-11	F: TGA ATT CAA TCA TTT GAC CAT TC R: GGA AGG GTG CTT CAA TTT GG	90–120	16	1,68	0,99	0,72
FS1-15	F: TCA AAC CCA GTA AAT TTC TCA R: GCC TCA ATG AAC TCA AAA AC	92–136	16	1,85	0,75	0,80
FS4-46	F: GCA GTC CTC CAC CAT TAC TA R: TAC AAC AGC AGG CTA TCC AT	213–372	43	2,30	0,62	0,85
Fagsyl-000905	F: GAT CAT AGC GCC GGA ATT GG R: GGT CCT CCT CCT GGT ACA AC	146–168	12	1,40	0,73	0,68
Fagsyl-001018	F: CGA GAT GGA CTT CTA AGT TTT ATT TGC R: CGA GAT GGA CTT CTA AGT TTT ATT TGC	96–120	13	1,57	0,76	0,75
Fagsyl-002929	F: GCG GCG ACT GGA ATA ATA GC R: CAA TCA CAC GCT GCA CAA AC	143–200	19	1,94	0,72	0,81
csolfagus-31	F: TCT ATT GAC ACA AGA ATA AGA ACA CC R: CTT GGC AAG AAA AGG GGA TT	106–128	12	2,06	0,83	0,84
sfc0036	F: CAT GCT TGA CTG ACT GTA AGT TC R: TCC AGG CCT AAA AAC ATT TAT AG	98–114	9	1,60	0,74	0,73

N_a – počet rozdílných alel v lokusech všech sledovaných vzorků buku lesního

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. 3: Počet rozdílných alel u populací buku lesního v jednotlivých lokusech

Populace	mfc 5	mfc 7	mfc 11	FS1-03	FS1-11	FS1-15	FS4-46
BK01	15	6	9	12	7	12	14
BK02	16	7	9	15	8	8	20
BK03	13	7	7	12	7	11	14
BK04	12	7	9	11	12	11	18
BK05	18	7	8	11	9	11	15
BK06	15	5	6	11	13	9	15
BK07	15	7	9	10	11	9	16
BK08	17	4	9	13	11	12	15
BK09	16	7	10	9	11	12	17
BK10	18	6	7	10	9	8	18
BK11	14	5	7	10	11	11	16
BK12	16	8	9	13	11	9	15
BK13	17	6	8	13	11	7	16

Populace	Fagsyl- 000905	Fagsyl-001018	Fagsyl-002929	csolfagus-31	sfc0036
BK01	4	7	12	10	8
BK02	6	6	12	11	8
BK03	4	6	9	12	7
BK04	4	7	11	11	7
BK05	6	6	12	12	7
BK06	7	9	12	10	7
BK07	4	9	9	11	7
BK08	8	8	11	10	8
BK09	8	8	13	11	8
BK10	8	10	10	10	7
BK11	9	7	12	10	6
BK12	9	7	9	10	7
BK13	8	9	11	11	7

Tab. 4: Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro sledované populace buku lesního

Popu- lace	BK01	BK02	BK03	BK04	BK05	BK06	BK07	BK08	BK09	BK10	BK11	BK12	BK13
<i>N</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>Na</i>	9,7	10,5	9,1	10,0	10,2	9,9	9,8	10,5	10,8	10,1	9,8	10,3	10,3
<i>I</i>	1,76	1,78	1,69	1,81	1,78	1,70	1,73	1,87	1,85	1,75	1,75	1,82	1,77
Privát. alely	0,15	0,23	0,23	0,46	0,15	0,23	0,23	0,31	0,15	0,23	0,15	0,39	0,08
<i>H_o</i>	0,68	0,68	0,68	0,73	0,71	0,73	0,71	0,71	0,71	0,75	0,68	0,70	0,68
<i>H_e</i>	0,76	0,75	0,74	0,77	0,76	0,73	0,75	0,78	0,77	0,75	0,75	0,76	0,75

N – počet analyzovaných stromů u sledovaných populací

Na – průměrný počet rozdílných alel u sledovaných populací z 12 mikrosatelitových lokusů

I – Shannonův informační index – zhodnocení genetické diverzity jednotlivých populací

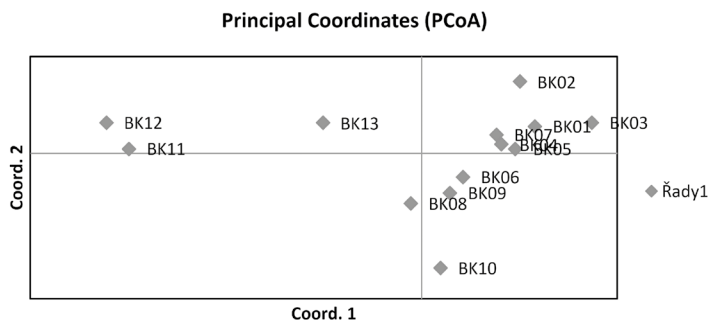
Privát. alely – počet privátních alel

H_o – průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti pro sledované populace

H_e – průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti pro sledované populace

Tab. 5: Hodnoty (F_{ST}) – vyjadřující vzájemné genetické diferenciaci mezi populacemi

Popu- lace	BK01	BK02	BK03	BK04	BK05	BK06	BK07	BK08	BK09	BK10	BK11	BK12	BK13
BK01	0,000												
BK02	0,010	0,000											
BK03	0,010	0,012	0,000										
BK04	0,009	0,010	0,015	0,000									
BK05	0,014	0,014	0,017	0,010	0,000								
BK06	0,013	0,016	0,015	0,012	0,014	0,000							
BK07	0,012	0,011	0,017	0,010	0,012	0,013	0,000						
BK08	0,013	0,017	0,019	0,012	0,016	0,015	0,016	0,000					
BK09	0,014	0,013	0,016	0,013	0,016	0,013	0,013	0,010	0,000				
BK10	0,017	0,023	0,022	0,015	0,018	0,015	0,018	0,014	0,012	0,000			
BK11	0,028	0,028	0,035	0,024	0,027	0,024	0,026	0,021	0,022	0,024	0,000		
BK12	0,028	0,028	0,037	0,026	0,029	0,027	0,027	0,020	0,024	0,028	0,009	0,000	
BK13	0,015	0,013	0,019	0,013	0,019	0,014	0,014	0,013	0,011	0,019	0,014	0,014	0,000



Obr. 3: Grafické znázornění genetických vzdáleností sledovaných populací buku lesního



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 8/2016