

CHLOROPLASTOVÁ SEKVENAČNÍ HAPLOTYPIZACE DUBU PRO STANOVENÍ PŮVODU A HOMOGENITY POPULACÍ

LESNICKÝ PRŮVODCE



doc. RNDr. JOSEF VLASÁK, CSc.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.



9/2016

Chloroplastová sekvenační haplotypizace dubu pro stanovení původu a homogenity populací

Certifikovaná metodika

doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Strnady 2016

Lesnický průvodce 9/2016

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 978-80-7417-120-8

ISSN 0862-7657

HAPLOTYPING OF OAK POPULATIONS BY CHLOROPLAST SEQUENCING REVEALS ORIGIN AND HOMOGENEITY OF POPULATIONS

Abstract

The aim of this publication is to present new method of DNA isolation from young oak leaves that enables efficient amplification of *trnD-trnT* region of chloroplast DNA and direct sequencing of crude PCR reaction mixture. Sequence data of *trnD-trnT* region have been used to examine *Quercus robur* and *Q. petraea* populations variability. High discrimination power of this method is demonstrated, comparable with previously used restriction analysis of four similar chloroplast DNA regions. Variable positions in *trnT-trnD* chloroplast DNA fragment are mapped and their use for oak haplotyping indicated. As an example, 20 Czech Republic oak populations were analyzed and their history, geographical origin and homo/heterogeneity were revealed.

Key words: cpDNA; DNA analysis; genetic diversity; phylogeny; phylogeography; *Quercus robur*; *Quercus petraea*

Oponenti: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Ing. Miloš Pařízek, Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem, pobočka Hradec Králové

Adresy autorů:

doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.

Biologické centrum AV ČR, v. v. i.

Branišovská 31/1160, České Budějovice 370 05

<http://www.bc.cas.cz>

e-mail: vlasak@umbr.cas.cz

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

<http://www.vulhm.cz>

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

Obsah:

I	CÍL METODIKY	7
II	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1	Úvod	7
2	Metodické postupy	11
a	Odběr vzorků a postupy izolace DNA	11
b	Postupy PCR amplifikace	14
c	Postupy sekvenování	16
d	Zpracování sekvencí	16
III	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	17
IV	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	18
V	EKONOMICKÉ ASPEKTY	19
VI	DEDIKACE	22
VII	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
VIII	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	23
	Summary	28

I CÍL METODIKY

Cílem je představit novou metodu stanovení tzv. chloroplastového haplotypu, která je rychlá, technicky jednoduchá a relativně levná, a která přinese jednoznačně hodnotitelné výsledky v krátké době. Metoda umožní získat informace o historii populací dubu letního a zimního, jejich původnosti a homogenitě. Tím pomůže určit populace vhodné pro ochranu a odběr semenného materiálu a v širším kontextu i geografický původ prodáváných semen nebo sazenic.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

Mapy rozšíření fosilního pylu (např. HUNTLEY, BIRKS 1983) ukazují, že v dlouhých obdobích čtvrtohorního zalednění nejhojnější evropské duby, dub letní (*Quercus robur* L.) a dub zimní (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) vymizely z většiny Evropy a přežily jen v několika málo izolovaných refugiiích v jižní Evropě. Odtud se v době poledové šířily na sever několika převažujícími směry. V poslední dekádě 20. stol. se objevily zprávy (KREMER et al. 1991; FERRIS et al. 1993, 1995, 1998), že přesná data o tomto procesu poskytuje analýza chloroplastové DNA. Ta je u dubů velmi málo proměnlivá i v oblastech, které nic nekódují, takže stromy z jedné populace se prakticky neliší. Rozdíly mezi populacemi bývají přesto výrazné, ale jen tehdy, pocházejí-li z různých refugií. V nich se totiž mutace nahromadily během statisíců let izolace podmíněné zaledněním. V relativně krátké době poledové, během šíření dubů na sever, se toho už moc nezměnilo. Ve Francii odhadli (PETIT et al. 2002b), že nově vzniklé populace mají na každých asi 50 km vzdálenosti od refugia nanejvýš jednu novou mutaci ve sledovaných částech chloroplastové DNA.

Studium mutací v chloroplastové DNA tedy umožňuje zjistit, ze které populační skupiny místní populace pochází, i kterou cestou se k nám dostala. Za posledních 20 let bylo spolupracujícími vědeckými skupinami analyzováno na 2600 populací evropských dubů, čímž byly zmapovány hlavní cesty jejich šíření v době poledové (PETIT et al. 2002a). Bylo zjištěno 6 hlavních genetických skupin A, B, C, D, E, F, které odpovídají hlavním refugiím a liniím šíření dubů na sever. Na naše území zasahují podle těchto studií pouze linie A a C z jižní Itálie; linie B ze Španělska je

v západní Evropě a linie E a F jsou východoevropské či asijské. Pro analýzu bylo vybíráno jen asi 5 stromů z jedné populace (z území ČR jen z 6 populací, PÉTTI et al. 2002a), protože se předpokládalo, že všichni jedinci v populaci jsou stejní. Nicméně, ve speciálních případech byly nalezeny i směsné populace, ze stromů různého původu. Studium mutací v chloroplastové DNA tedy umožňuje zjistit, zda je vybraná populace geograficky správně situována podle fylogeografických map a zda je opravdu homogenní. Oba tyto znaky svědčí pro původnost dané populace; naopak cizokrajný chloroplastový genom nebo směsný charakter svědčí pro vysazený les. Analýza chloroplastových mutací tedy jednak vypovídá o tisícileté historii studovaného lesa, jednak má velký význam při posuzování vhodnosti dané populace k odběru semen pro další reprodukci.

Pro jednotné zpracování výsledků z mnoha evropských laboratoří bylo nutno zvolit jednotnou metodu analýzy mutací, jejíž podstatu zde krátce vyložíme: z celkové délky chloroplastového genomu (asi 160 000 bp) byly vybrány 4 nekódující úseky vhodné délky, umístěné mezi silně konzervovanými geny, vesměs pro transferové RNA. Úseky se označují DT (~1750 bp, mezi geny pro transferovou RNA asparagové kyseliny *trnD* a threoninu *trnT*), TF (~1800 bp, mezi geny *trnT* a *trnF*), CD (~3100 bp, mezi *psbC* a *trnD*) a AS (~3700 bp, mezi *psaA* a *trnS*). Tyto úseky chloroplastové DNA představují sotva 0,01% z celkové izolované DNA stromu, ale přesto se snadno získají ve vysoké čistotě pro analýzu, aniž by bylo třeba je složitě izolovat. Na okrajích totiž mají unikátní úseky DNA silně konzervovaných genů, k nimž je možno nasyntetizovat komplementární primery (oligonukleotidy), které se k nim v roztoku denaturované DNA se 100% přesností připojí. Metodou PCR amplifikace, tedy v podstatě rekurentní syntézou DNA *in vitro*, začínající na těchto primerech, namnožíme přímo ve zkumavce úsek mezi primery miliardkrát, takže ostatní součásti preparátu DNA (jiné úseky chloroplastové DNA, jaderná a mitochondriální DNA) se stanou jen zanedbatelnou příměsí.

Touto metodou získané 4 fragmenty DNA jsou pak štěpeny různými restrikcími endonukleázami, tedy enzymy, které štěpí DNA jen v místě určité sekvence. Změna sekvence (mutace) znemožňuje nebo naopak umožňuje štěpení. Rozštěpené DNA byly analyzovány na polyakrylamidových gelech s vysokým rozlišením a mezipopulační rozdíly ve štěpném vzorci pak byly složitým způsobem vyhodnocovány. Správné vyhodnocení vyžadovalo porovnat konkrétní štěpný obrazec se standardy získanými ze zástupců populací z celé Evropy.

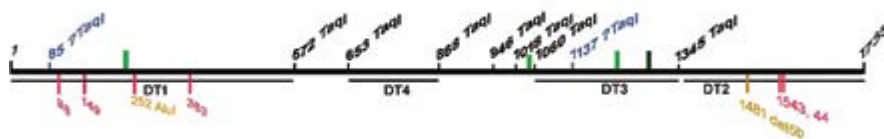
Soubor mutací na chloroplastovém genomu v určité populaci se často označuje jako haplotyp, protože chloroplastová DNA se u dubů přenáší na potomstvo maternálně, aniž by se uplatnil jejich diploidní charakter (tedy přenáší se nezměněná, neuplatní se mísení rodičovských genů). Metoda charakterizace populací podle těchto mutací je také známa jako haplotypizace populací. Nejvíce haplotypů bylo získáno stu-

diem oblasti DT, kde se po štěpení enzymem TaqI (v místě TCGA) hodnotí velikost 4 větších fragmentů (další 4 fragmenty gel nerozliší) a také občasná přítomnost místa AGCT pro enzym AluI. Studium dalších tří oblastí umožnilo rozdělit každý z původních 11 haplotypů na asi 3 podtypy, takže dnes je rozeznáváno asi 30 haplotypů, které se podle vzájemné příbuznosti sdružují do výše uvedených 6ti skupin A, B, C, D, E, F.

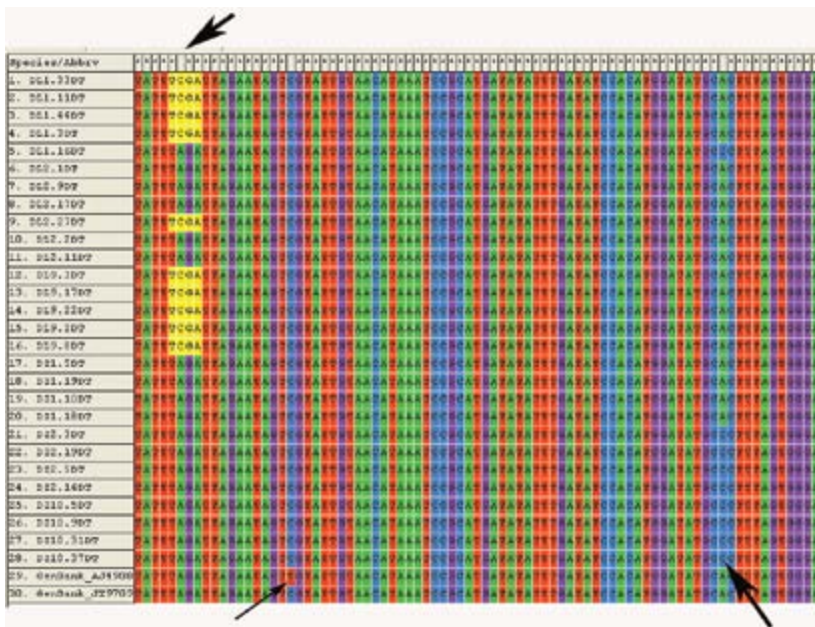
Zjevným nedostatkem této metody, kromě problematického vyhodnocování, je ignorování všech rozdílů mimo sekvenční místa pro restriktivní endonukleázy. Sekvenováním vzorků z různých českých populací dubů jsme ukázali (Obr. 1, 2), že i v malém prostoru České republiky se dá nalézt v DT oblasti 5 nových variabilních posic (polymorfismů), tedy míst, kde se různé populace liší v jedné bázi. Spolu se 4 už známými variabilními místy, která ovlivňují restriktivní štěpení, to představuje dostatečné množství polymorfismů pro určení pravděpodobně všech 30 haplotypů evropských dubů jen z tohoto jediného úseku.

Jsou zobrazena konstantní Taq I místa, která definují oblasti DT1, DT2, DT3 a DT4 hodnocené v PETIT et al. (2002a, 2002b). Občasná Taq I místa jsou modře. Kolmé fialové čárky označují nově zjištěná variabilní místa, zelené čárky variabilní úseky polyA, resp. polyT. Mutace 252 bp vytváří občasná AluI místo.

Princip nové metody tedy spočívá v tom, že ze 4 původně navržených fragmentů chloroplastové DNA amplifikujeme jen ten, který poskytuje nejlepší rozlišení a amplifikáty necháme komerčně sekvenovat. Získáme přibližně tolik sekvenčních informací jako restriktivním štěpením 4 fragmentů a ušetříme náklady na 75 % amplifikací, štěpení restriktivními endonukleázami a na problematické polyakrylamidové gely a jejich vyhodnocování. Laboratorní práce jsou omezeny na minimum: izolace DNA a PCR amplifikace, jejíž produkt se odešle komerční firmě k sekvenování. Výsledky dostaneme ve formě sekvence, takže jsou snadno zpracovatelné volně dostupnými programy pro porovnání příbuznosti sekvencí. Výsledky jsou navíc značně kompatibilní s výsledky klasické metody PETIT et al. 2002a, protože



Obr. 1: Mapa DT oblasti chloroplastové DNA u dubů (VLASÁK et al. 2016)



Obr. 2: Alignment cpDNA DT sekvencí několika dubů z 6 populací (část)

sekvenováním zjistíme kromě nových polymorfismů i ta restriční místa, která jsou základem pro stanovení haplotypů klasickou metodou.

Šipky ukazují variabilní pozici 85bp s příležitostným TaqI místem a nově objevené variabilní pozice 98 bp a 149 bp.

Nově vzniklé náklady na sekvenování nejsou velké. Pokud dostaneme sekvenci celého 1750b dlouhého DT úseku sekvenací z jeho konců, jde o dvě sekvenační reakce asi po 100 Kč. To je možné jen tehdy, předáme-li sekvenační firmě perfektní amplifikáty, protože délkový limit dobře čitelné sekvence je v současné době asi 900 bp. Při vývoji metody jsme tedy věnovali největší pozornost optimalizaci metody DNA izolace a PCR amplifikace. Uvedené protokoly umožňují standardně získávat kvalitní amplifikáty, které se dají přímo, bez čištění sekvenovat.

2 Metodické postupy

a Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Nejvhodnější období pro odběr rostlinného materiálu je jarní období, kdy lze odebírat rašící pupeny nebo mladé listy. U starších listů z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů se snižuje kvalita i kvantita vyizolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR amplifikace. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se tedy při odběru označí, uloží do mikrotenového sáčku a udržují při nízké teplotě (chlادové tašky s namraženými destičkami) a co nejrychleji přepraví ke zpracování v laboratoři. Vzhledem k následným analýzám je důležité vzorky držet stále při nízké teplotě. DNA lze izolovat okamžitě z takto čerstvě odebraných vzorků. V případě, že izolace 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 s následným vzduchotěsným uzavřením v nádobách (lze použít např. plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Takto vysušený (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 pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Touto metodou lze v krátkém časovém úseku získat kvalitní eluáty DNA. Izolace DNA ze starších listů dubů byla úspěšně provedena pomocí Chemagic DNA Plant kitu (Perkin Elmer, chemagen). Tento postup však vyžaduje pořízení separátoru magnetických částic a je časově náročnější.

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

Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá etanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Nechá se nahřívát inkubační lázeň na 65 °C a v případě výskytu sraženin v pufrách AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

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 do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 ml pufru API a následně 4 ml Rnázy A, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2–3× převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 ml pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 rpm.
4. Vzniklý 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 přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
6. Přidá se pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5 násobku objemu odebrané frakce a ihned pipetováním promíchá.
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 kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 ml pufru AW2 a centrifugujeme 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, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 ml AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové vybavení:

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

Chemikálie: DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN, 96–100% etanol

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím Chemagic DNA Plant Kitu.

1. Rostlinný materiál 20–50 mg je potřeba rozdrtit na jemný prášek, například ho můžeme utřít v tekutém dusíku v třecích miskách. Rozdrčený materiál se přendá do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a napipetuje se k němu 400 ml lyzačního pufru (Lysis Buffer 1) a následně 2 ml Rnázy A, směs se pomocí vortexu důkladně promíchá.
2. Centrifugujeme 5 minut při rychlosti 12 000 rpm a tekutinu nad sedimentem přepipetujeme do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
3. Přidáme 30 ml resuspendovaných magnetických kuliček (Magnetic Beads) a 320 ml pufru 2 (Binding Buffer 2). Promícháme 6× pipetováním a inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přemístíme zkumavky do separátoru magnetických částic, kde se magnetické kuličky přitáhnou po 2 minutách ke stěně. Odpipetujeme tekutinu a vyjmeme zkumavky ze separátoru.
5. Napipetujeme do zkumavky 900 ml promývacího pufru 3 (Wash Buffer 3), promícháme 15× pipetováním nahoru dolů a 1 minutu inkubujeme při pokojové teplotě. Provedeme separaci kuliček pomocí separátoru magnetických částic a odpipetujeme tekutinu.
6. Opakujeme promytí s přidáním 900 ml promývacího pufru 4 (Wash Buffer 4) dle bodu 5.
7. Opakujeme promytí s přidáním 900 ml 70% etanolu dle bodu 5.
8. Po odpipetování tekutiny ponecháme zkumavky v separátoru, v němž budou kuličky přitahované ke straně zkumavky, opatrně přidáme 1 ml promývacího pufru 5 (Wash Buffer 5), abychom nenarušili pelet. Za 1 minutu promývací pufr 5 odpipetujeme.
9. Přidáme do zkumavky 200 ml elučního pufru (Elution Buffer 6) a resuspendujeme magnetické kuličky pipetováním.
10. Inkubujeme suspenzi 10 minut při 55 °C a jemně promícháváme pro usnadnění eluce DNA.
11. Umístíme zkumavky do separátoru magnetických částic, po 1 minutě dojde k separaci magnetických kuliček v roztoku, pak odpipetujeme eluát DNA do nové zkumavky.

Požadované přístrojové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, separátor magnetických částic, mrazicí box, sada pipet a příslušné špičky, mikrozkuhavky 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

Chemikálie: Chemagic DNA Plant kit (Perkin Elmer, Chemagen), 70% etanol, Rnáza A (100 mg/ml)

U vyzolované DNA lze zjistit koncentraci v ng/μl a čistotu (na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm) např. přístrojem Nanophotometer (Implen). Koncentrace DNA se nejčastěji u obou druhů dubu pohybovaly v rozmezí 20–80 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. 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 amplifikaci DT oblasti chloroplastové DNA dubů jsme použili primery trnD (5'-ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC) a trnT (5'-CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG), které navrhli DEMESURE et al. 1995. Pro 40 vzorků jsme připravili na ledu 600 ml reakční směsi obsahující ExTaq DNA polymerázu TAKARA, ExTaq pufr TAKARA, směs čtyř dNTP a oba primery, každý 0,12 μM. Přesný rozpis komponent je v tabulce 1.

Tab. 1:

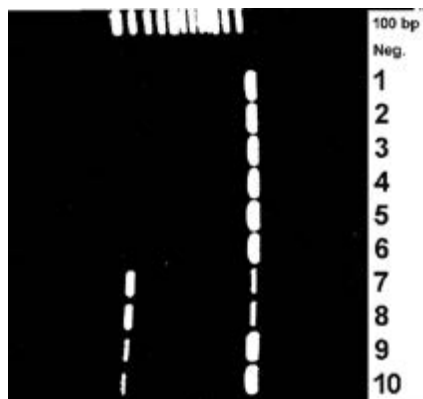
Reakční směs 600 ml	ml
Destilovaná voda	438
10 x TAKARA ExTaq pufr	60
10 x TAKARA dNTP směs 2.5mM	60
trnD primer, 4 μM	18
trnT primer, 4 μM	18
ExTaq DNA polymeráza, 5U/ml	6

Do prázdných, tenkostěnných PCR mikrozkušavek 0,2 ml jsme pipetovali po 0,5 ml (asi 5 ng) DNA jednotlivých vzorků a pak přidali (stále na ledu) po 15 ml reakční směsi. PCR byla prováděna v cykleru BIOMETRA T3 s programem uvedeným v tabulce 2.

Tab. 2:

Počet cyklů	Teplota	Čas	Popis
1	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
35	94 °C	5 sec	Denaturace
35	55 °C	15 sec	Annealing
35	72 °C	60 sec	Elongace (syntéza)
1	72 °C	3 min	Finální elongace
1	4 °C	úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Dobu denaturace a annealingu je pravděpodobně třeba modifikovat (prodloužit) při použití jiných PCR zkumavek nebo jiného cykleru. Typický výsledek amplifikace po nanesení 4 ml PCR produktu na agarózový gel je na Obr. 3.



Obr. 3: PCR produkty na agarózovém gelu

Vzorky 1–6 (odpovídající jednotlivých stromům) jsou vhodné pro přímé sekvenování, vzorky 7, 8 jsou nevhodné, vzorky 9 a 10 lze použít jen po izolaci pozitivního pruhu 1700b z gelu, což je procedura, které se obvykle snažíme vyhnout. Kontaminující pruh 180b se často objevuje při amplifikaci DNA horší kvality a při přímém

sekvenování znemožňuje přečtení sekvence na začátku a na konci. Do značné míry se dá eliminovat nízkou koncentrací primerů v PCR reakci (viz výše; asi poloviční proti normálu). DNA z kvalitně provedeného odběru a izolace obvykle poskytuje 80–90% perfektních amplifikátů. Je možné je posílat na sekvenování i bez kontroly na agarózovém gelu, smíříme-li se s určitým procentem nečitelných sekvencí, které se z hodnocení vyřadí.

c Postupy sekvenování

Dnes existuje řada firem, které poskytují sekvenační služby za velmi rozumnou cenu, která se navíc rok od roku snižuje. My využíváme velmi praktický systém firmy GATC Biotech AG (Německo). Přes jejího zástupce v ČR, firmu Biogen (biogen@biogen.cz) si objednáme štítky s čárovým kódem, které se lepí na sekvenační zkumavky. Firma štítky pošle poštou (jeden štítek asi za 100 Kč) a zaregistruje je v centrále GATC na jméno a e-mail odběratele. Sekvenační vzorky připravíme smícháním 4 ml PCR směsi a 6 ml 4 μ M primeru v normální 1,5 ml mikrozkuhavce, přilepíme štítek a hodíme do sběrné schránky kdekoli je to možné, protože čárový kód jednoznačně určuje zákazníka. Sběrné schránky GATC/Biogen jsou dnes v ústavech Akademie věd ČR i v mnoha dalších institucích; doručovatelská služba je jednou denně vybírá a odváží do Německa. Asi za 40 hodin po vybrání schránky přijde e-mail, že si můžete sekvence stáhnout se serveru firmy GATC.

d Zpracování sekvencí

Kromě originálního chromatogramu ze sekvenační reakce dostaneme od firmy také tzv. FASTA soubory se sekvencemi – v podstatě textové soubory (Notepad), kde se všechno v řádce za znakem > považuje za název sekvence a to, co je na dalším řádku (prázdné řádky se nepočítají), je vlastní sekvence (až do dalšího znaku >, kde začíná svým názvem jiná sekvence). Všechny sekvence, které chceme analyzovat, musíme dát do jednoho FASTA souboru pod sebe (a uložit s koncovkou XXX.fas – jinak je programy „nevidí“). Na Internetu je volně dostupná řada programů pro zpracování sekvencí; my používáme značně universální a uživatelsky přívětivý program MEGA6 (TAMURA et al. 2013). Na pokyn „align“ napřed natáhneme sekvence ve FASTA souboru do programu a provedeme alignment, tedy vzájemně

přiřazení podle shodnosti sekvencí, jako na Obr. 2. V modu alignmentu provedeme další úpravy. Především ořízneme konce na obou stranách, kde jsou některé sekvence kvůli špatnému začátku/konci kratší než jiné, a zarovnáme je na stejnou délku. Velmi důležitá je přesnost sekvenování. V celé 1750 bp dlouhé DT oblasti je jen 19 nekonstantních míst, z nichž ale jen 9 přispívá k variabilitě (např. 4 proměnlivé polyA/polyT úseky jsou u konkrétního haplotypu identické u všech jedinců). Každá sekvenační chyba je tedy významná, protože imituje nový haplotyp. K jejich eliminaci můžeme buďto otevřít originální chromatogramy ve vhodném programu a zkontrolovat kritická místa, což je při množství sekvencí velmi pracné, nebo jednoduše v alignmentu odstranit prostředních asi 600 bp, pokud se tam nějaké mutace vyskytují. Sekvenační chyby se totiž normálně objevují jen na konci sekvence, nad 600 bp; tedy z obou konců máme 600 bp více jistých. Podle našich výsledků asi s 400 stromy z 20 různých populací se v prostředních 600 bp DT oblasti žádná významná variabilní místa nevyskytují (Obr. 1), a proto je možno tuto část odstranit bez ztráty informace. Upravený alignment převedeme v témže programu na formát XXX.meg, a pomocí pokynu phylogeny“ vytvoříme stromeček ukazujícího fylogenetickou příbuznost jednotlivých populací.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novým přínosem prezentovaných postupů je možnost zjišťování původnosti populací dubu zimního a letního na základě sekvenování úseku DT chloroplastové DNA. V minulosti, a to jen v zahraničí, byly studovány mutace na chloroplastové DNA jen na základě štěpných fragmentů, což v porovnání s prezentovanou metodikou představuje daleko pracnější a ne tak přesnou metodu.

Sekvenační haplotypizace dubů je tedy metoda, která dosud nebyla nikdy použita, přestože je zřejmé, že využívá pokroku v molekulární biologii mnohem efektivněji, než klasické štěpení restrikcími nukleázami. Výsledky jsou do značné míry kompatibilní s výsledky štěpení a snáze zpracovatelné.

Komplexní informace o původu významných populací nebo porostů dubu letního a zimního v ČR, získané na základě molekulárně-genetických metod, dosud nebyly zpracovány. Doposud získané poznatky o proměnlivosti dubových porostů vycházely převážně z hodnocení provenienčních ploch pomocí fenotypového šetření porostů.

IV POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vypracována za účelem zjišťování původnosti populací dubu zimního a letního na základě haplotypizace, to je zjišťováním typu mutací na úseku DT chloroplastové DNA. Pro vypracování a ověření metodiky byli využiti dospělí jedinci dubu letního a zimního významných populací, rostoucích převážně v genových základnách na území České republiky. Sledování mutací v chloroplastové DNA umožňuje určit homogenitu populací a ověřit geografické umístění podle fylogeografických map. Pomocí těchto znaků lze ověřit původnost populace; v případě detekce cizokrajného chloroplastového genomu nebo směsného charakteru je možno usuzovat na alochtonní původ populace. Stejným způsobem je možno zjistit původnost (geografickou příslušnost) a homogenitu sadbového materiálu, semen apod.

Názory na využívání semen z původních populací k výsadbě nejsou zcela jednotné. Zatímco dříve publikované pokyny jednoznačně preferují místní původní populace jako zdroj semenného materiálu (např. tzv. Helsinské směrnice, MCPFE 1993), nově se objevují názory, že očekávaným klimatickým změnám musíme čelit částečným využíváním semenného materiálu z populací jižního původu (ANON 2010). Ať zvítězí ten či onen názor, publikovaná metodika umožní rychlou kontrolu semenného materiálu a jeho zdrojů.

Ve 20 studovaných populacích dubů se nám podařilo identifikovat 8 haplotypů, z nichž ale jen 4 jsou zřejmě původní, přítomné v celé populaci, a 4 v jednotlivých stromech, zřejmě „dovezené“ s cizokrajnou výsadbou. Haplotypy linie C byly zjištěny jen v jižních Čechách (Třeboň, Hluboká, Třešť); v jedné jihočeské populaci dubu zimního (Vojířov) byl nalezen unikátní haplotyp z balkánské linie E, která u nás dosud nebyla zjištěna, ale vyskytuje se v sousedním Rakousku. Ve středních Čechách převažuje haplotyp 26 (PETIT et al. 2002a) z linie A a na Moravě haplotyp 5 z téže linie.

Z 10 populací dubu zimního jich bylo 8 zcela homogenních (všechny stromy stejný haplotyp) a jen 2 (Hluboká, Vojířov) měly několik přimíšených stromů převažujícího středočeského haplotypu 26 (A). Naopak, z 10 populací dubu letního byly jen dvě homogenní a ostatní měly přimíšené stromy občas s velmi neobvyklými haplotypy (i z linie B, Španělské, která je rozšířena jen v západní Evropě). Stromy těchto haplotypů rostly jednotlivě vesměs na exponovaných místech – na okraji lesa, v parkových částech apod. To naznačuje, že nová výsadba se týká především dubu letního.

Unikátní byla populace dubů letních z Hluboké (Nová Obora), kde byl zjištěn přibližně stejný počet jedinců haplotypu 1 (linie C) a haplotypu 26 (A), navzájem pro-

míšených. Předpokládáme, že při zakládání obory došlo k masivnímu vysazování dubů středočeského haplotypu 26.

Metodické postupy zjišťování původu populace budou sloužit pro potřeby státní správy v oblasti lesního a vodního hospodářství (MZe, MŽP) a koordinátora Národního programu (ÚHÚL), přičemž se předpokládá jejich promítnutí do legislativních předpisů a dotační politiky ČR.

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

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

Dub (dub zimní a dub letní) je v našich podmínkách z hlediska svého hospodářského uplatnění důležitý druh dřeviny, který významným způsobem ovlivňuje ekonomiku řady lesních majetků (především v nižších polohách) všech forem vlastnictví, a tedy i celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-dřevařského sektoru). Z hlediska dalších aspektů lesnického hospodaření má značný potenciál do budoucna z důvodu 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 obmýtu u dubových porostů (pozn.: kon-

krétně u dubu zimního) nacházejících se v současných genových základnách (GZ), oproti ostatním dubovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu, činí v objemovém vyjádření cca 116 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 dubu 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 dubu ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví konstruována na základě:

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

Při dlouhodobě dosahovaném celostátním průměrném podílu sortimentů surového dříví v dodávkách listnatého dříví (pilařská kulatina 33 %, vláknina a ostatní průmyslové dříví 27 %, palivové dříví 40 %) a při ceně surového dříví za 2. čtvrtletí 2016 ve výši 3 397 Kč/m³ za pilařskou kulatinu III. tř. jakosti A/B, 1 097 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 dubových porostů v GZ v době obmýti částku 219 300 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 49 200 Kč/ha (průměrné celostátní náklady činí 423 Kč/m³) pak představuje zvýšený čistý výnos ve výši 170 100 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob dubových porostů a příznivými cenami na trhu se surovým dřívím. 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 pilařské 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 mylně 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 obmytí, ale již také v rámci výchovných opatření v podobě zlepšení (zvýšení) cash flows z provedených probírek, což rovněž pozitivně ovlivní ekonomickou situaci vlastníků lesa a přispěje k podpoře ekonomického pilíře trvale udržitelného hospodaření v lese.

Je nutno rovněž připomenout, že provedená kalkulace se zabývá pouze oceněním změny v kvantitativních parametrech (v objemu). Jen z důvodu současné neznalosti řady potřebných ekonomických veličin nejsou do výpočtů zařazeny také další dodatečné ekonomické efekty vyplývající z lepších kvalitativních parametrů porostů, které by se projeví 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 mylní výtěžky) 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 laboratorní analýzy DNA, uvedené v metodice, jsou kalkulovány s předpokladem, že uživatel má základní laboratorní přístrojové vybavení pro analýzu DNA. Podle předkládané metodiky jsou náklady spotřebního materiálu na vzorek, včetně izolace DNA a PCR amplifikace 175,- Kč a dalších 200,- Kč na komerční sekvenování; celkem tedy 375,- Kč včetně DPH.

VI DEDIKACE

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QJ1230334.

Podíly práce autorů na vypracování metodiky: doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc. 60 %, Ing. Helena Cvrčková, Ph.D. 20 %, Ing. Pavlína Máchová, Ph.D. 20 %.

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

ANON 2010. Managing ancient and native woodland in England. Forestry Commission England Practice Guide.

DEMASURE B., SODZI N., PETIT R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129–131.

DUMOLIN-LAPÈQUE S., DEMASURE B., FINESCHI S., LE CORNE V., PETIT R.J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.

FERRIS C., OLIVER R.P., DAVY A.J., HEWITT G.M. 1993. Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Molecular Ecology* 2: 337–344.

FERRIS C., OLIVER R.P., DAVY A.J., HEWITT G.M. 1995. Using chloroplast DNA to trace postglacial migration routes of oaks into Britain. *Molecular Ecology* 4: 731–738.

- FERRIS C., KING R.A., VAINOLA R., HEWITT G.M. 1998. Chloroplast DNA recognises three refugial sources of European oaks and shows independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity* 80: 584–593.
- HUNTLEY B., BIRKS H.J.B. 1983. An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.
- KREMER A., PETIT R., ZANETTO A. et al. 1991. Nuclear and organelle gene diversity in *Quercus robur* and *Q. petraea*. In: M. ZIEHE, G. MULLER-STRACK (Eds.), *Genetic Variation of Forest Tree Populations in Europe*, pp.141-166. Sauerlanders Verlag, Frankfurt am Main.
- MCPFE. 1993 Ministerial Conference on Protection of Forests in Europe. Conference Proceedings. In: Ministry of Agriculture and Forestry, Helsinki, Finland.
- PETIT R.J. et al. (28 authors), 2002a. Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5–26.
- PETIT R.J. et al. (28 authors), 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49–74.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- VLASÁK J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MALÁ J.: Rychlá haplotypizace populací dubu sekvenováním chloroplastové oblasti *trnD-trnT*. (Chloroplast trnD-trnT Region Sequencing for Quick Haplotyping of Oak Populations.). *VEGETOS*, 29, 2016 (2) <http://dx.doi.org/10.4172/2229-4473.1000124>
(dedikace: projekt č. QJ1230334)

HAPLOTYPING OF OAK POPULATIONS BY CHLOROPLAST SEQUENCING REVEALS ORIGIN AND HOMOGENEITY OF POPULATIONS

Summary

Chloroplast DNA (cpDNA) markers have often been used to assess genetic variability among European oak populations (KREMER et al. 1991; DUMOLIN-LAPEGUE et al. 1997) and to examine their postglacial migration history (PETIT et al. 2002b). Molecular studies indicated that most of cpDNA differentiation took place in small oak refugia in southern Europe during prolonged periods of ice age isolation (FERRIS et al. 1993). Because of slow rate of cpDNA mutation, northward expansion of oak at the end of the last ice age retained many refugial cpDNA characteristics in recently established populations. Cp DNA analysis of native European oak populations thus enables to identify the original refugium in Southern Europe as well as probable migration routes (PETIT et al. 2002b).

In oak migration studies, thousands of oak DNA samples have been prepared in many laboratories over the whole Europe and a very simple method of cpDNA sequence variation analysis has been adopted. Generally, noncoding cpDNA sequence flanked by strongly conserved regions mostly of tRNA genes has been amplified using primers derived from the conserved regions. The resulting PCR product was digested with restriction enzymes in an effort to find restriction sites typical for some populations. Most of laboratories have used about 1700 bp long intergeneric region DT between *trnD* and *trnT* genes where mutations generating new TaqI or AluI sites and also insertions/deletions in TaqI fragments were discovered in some populations, which allowed to define 11 haplotypes of European oaks. Exploiting in a similar way of three other variable regions, *trnT/trnF* (TF, about 1800 bp), *psaA/trnS* (AS, about 3700 bp), and *psbC/trnD* (CD, about 3100 bp) enabled to split the original DT haplotypes in several subtypes so that the number of European oak haplotypes could increased to 32 (PETIT et al. 2002a).

In this paper, we describe in detail an alternative, sequencing procedure of oak chloroplast haplotyping, for disclosing origin and genetic structure of *Q. petraea* and *Q. robur* populations. We have shown that DT region alone contains many yet undiscovered variable sites, which can define probably all or nearly all haplotypes identified by PETIT et al. (2002a), who used four variable chloroplast region. To further cut down the costs, we have developed a method of oak DNA isolation and amplification where unpurified PCR reaction mixture can be used directly for the sequencing of the whole 1750b long DT region.

Oak twigs with young leaves were sampled in April and immediately processed or lyophilized. 100 mg of fresh or 20 mg of lyophilized young leaves were homogenized under liquid nitrogen by mortar and pestle and transferred to 1.5 ml Eppendorf. Total genomic DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) following the Quick-Start protocol. PCR of cpDNA DT region was performed using the universal chloroplast primers *trnD* (5'-ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC) and *trnT* (5'-CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG) of DEMESURE et al. (1995), which match the intergeneric region between chloroplast *trnD* and *trnT* genes. For 40 DNA samples, 600 µl of PCR master mix was prepared containing 6 ml (30 U) of Ex Taq DNA polymerase TAKARA, ExTaq buffer TAKARA, 25 µM of each deoxynucleotide triphosphate and 0.012 µM of each primer. 15 µl of master mix was added to ~ 5 ng (0.5 µl) of DNA in 0.2 ml PCR tube and amplified in BIOMETRA T3 thermal cycler using initial denaturation for 3 min. at 94°C followed by 35 cycles of denaturation (5 s at 94°C), annealing (15 s at 57°C) and extension (1 min. at 72°C) with a final extension 5 min. at 72°C. To 5 µl of unpurified PCR product, 6 µl of either *trnD* or *trnT* primer (4 µM) was added, and the mixture was commercially sequenced by GATC Biotech AG, Germany.

Preliminary results with 20 Czech Republic oak populations are also presented. 8 different haplotypes were identified, 4 of which are widely distributed and probably native, whereas other 4 may represent trees introduced from foreign populations. Haplotypes in Southern bohemia belong to lineage C of PETIT et al. (2002a); in other regions to lineage A. Eastern (moravian) populations show usually haplotypes different from western (Czech) populations. *Q. petraea* populations are nearly always homogeneous, probably native, but *Q. robur* populations mostly contain trees with foreign haplotypes.



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 9/2016