

**OVĚŘENÍ IDENTITY A TESTOVÁNÍ KLONŮ
V SEMENNÝCH SADECH BOROVICE
A MODŘÍNU S VYUŽITÍM GENOVÝCH
MARKERŮ**

Recenzovaná metodika

**Ing. Ondřej Ivanek, CSc.
prom. biol. Zdeňka Procházková, CSc.**

Strnady 2008

Lesnický průvodce 10/2008

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště
<http://www.vulhm.cz>

Odpovědný redaktor: Mgr. E. Krupičková
e-mail: krupickova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-008-9
ISSN 0862-7657

VERIFICATION OF IDENTITY AND CLONE TESTING IN PINE AND LARCH SEED ORCHARDS WITH USING GENE MARKERS

Abstract

Seed orchards in the Czech Republic have been established on the basis of individual selection represent synthetic populations of genetically-diverse origin. There are several levels of genetic diversity in the seed orchards. The methodology presented in this paper deals with the diversity at the enzymatic level. Using isozyme analysis characterized by the combination of alleles differentiated according to electrophoretic mobility, researchers can identify and verify the genetic characterizations of clones and grafts and the parent trees.

Key words: seed orchards, grafts identification, clone verification, isozymes, gene markers, DNA

Recenzenti: Doc. Ing. Milan Lstibůrek, Ph.D.
Ing. Miroslav Řešátko, CSc.

Foto 1: (titulní strana): Semenný sad borovice lesní č. 79 - Doubrava, LS Plasy

Adresa autorů:

Ing. Ondřej Ivanek, CSc., prom. biol. Zdeňka Procházková, CSc.
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště
e-mail: ivanek@vulhm.cz

Obsah:

CÍL METODIKY	7
VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
Úvod	7
Výběr klonů, odběr a skladování vzorků	9
Analýzy genových markerů	10
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	13
POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	14
DEDIKACE	14
LITERATURA	15
Seznam použité související literatury	15
Seznam publikací, které předcházely metodice	17
SUMMARY	18

CÍL METODIKY

Cílem testování klonů v semenných sadech s využitím genových markerů je spolehlivé ověření deklarované identity klonů a roubovanců, jejich kontrolní porovnání s rodičovskými stromy a tím vytvoření kvalifikovaného podkladu pro uznávání semenných sadů jako významných zdrojů reprodukčního materiálu. Ověření identity klonů je dále bezpodmínečným předpokladem pro zakládání sadů vyšších generací.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Úvod

Semenné sady v ČR jsou účelovými výsadbami potomstev klonů zakládaných z roubovanců rodičovských stromů jako výsledek individuální selekce jedinců a určitého šlechtitelského záměru. Semenné sady tak představují syntetické populace, resp. soubory klonů, jejichž původ je v některých případech dosti rozmanitý. Produkce osiva v semenných sadech může být velmi variabilní, často bývá znatelně ovlivněna migrací pylu z okolních i vzdálených porostů. Výsledná produkce sadu, kromě zmiňovaných faktorů, je též významně závislá na schématu výsadby, resp. prostorovém rozmístění klonů. V rámci tzv. hybridních sadů jsou soustředovány klony z různých přírodních lesních oblastí a lesních vegetačních stupňů, zatímco v jiných sadech pocházejí klony pouze z jedné nebo více vybraných PLO. V rámci ČR se v současnosti jedná vesměs o semenné sady první generace (obr. 1, 2).

Semenné sady se zakládají podle dokumentace, která musí být schválena a registrována pověřenou osobou. Lokalizace sadů se vybírá tak, aby byla zachována dostatečná izolační vzdálenost od stromů a porostů téhož druhu. Součástí vyžadované dokumentace je počet a soupis klonů, včetně údajů o jejich původu a provenienci a plán výsadby a rozmístění roubovanců jednotlivých klonů v sadu, aby byla možná identifikace každého jedince.



Obr. 1: Semenný sad borovice lesní č. 154- Rudíkovy, LS Město Albrechtice

Genetická proměnlivost sadů se projevuje na několika úrovních. Jde o kvalitativní znaky, zjistitelné morfologicky na fenotypové úrovni a dále o znaky kvantitativní, měřitelné a vyhodnotitelné na základě kvantitativních genetických metod, s využitím genových markerů, zejména isoenzymů a DNA. Další typ představuje proměnlivost chromozomální nebo cytogenetická. Z hlediska sledování proměnlivosti populací a ověřování identity klonů a roubovanců v semenných sadech se významně uplatňuje sledování polymorfismu na úrovni enzymů. Genetickou proměnlivost přímo na úrovni DNA umožňují molekulárně genetické metody jako RFLP, PCR, mikrosatelity či přímé sekvenování DNA. Z hlediska předkládané metodiky je důležitá proměnlivost na enzymatické úrovni, kdy se při ověřování identity klonů a roubovanců vychází z polymorfismu konkrétních lokusů, jejich počtu a dalších parametrů. Výsledky isoenzymových analýz roubovanců, zejména v některých semenných sadech borovice lesní prokázaly různě vysoký podíl nesprávně označených (evidovaných) roubovanců. K této situaci může dojít různými způsoby, počínaje chybným označením roubovanců při sběru, roubovanců při roubování i při výsadbě, při vylepšování (nahrazování uhynulých roubovanců jedinci stejného klonu nebo i klonů odlišných) nebo přehlédnutím toho, že po uhynutí rouby v sadu roste pouze podnož, vedená jako roubovanec. Přitom veškeré zásahy, to znamená i změny v počtu a zastoupení klonů i roubovanců, musí být povoleny, evidovány a registrovány pověřenou osobou. Jak však ukazují výsledky inventariza-

ce v sadech, v nezanedbatelném počtu případů nejsou tyto požadavky dodržovány. Problémy týkající se skutečné identity roubovanců jsou známy u semenných sadů borovice lesní, modřínu opadavého a smrku ztepilého a dokladovány i v zahraničí (např. Slovensko, Německo).

Semenné sady jsou uznanými zdroji kvalifikovaného reprodukčního materiálu a poskytují vyšlechtěný generativní materiál vysoké genetické i fyziologické kvality. Proto by měli mít jak vlastníci těchto zdrojů, tak i budoucí odběratelé reprodukčního materiálu, jistotu, že se skutečně jedná o zdroj s deklarovanými klony. Rovněž při šlechtitelských programech, kdy se využívá osivo z jednotlivých sadů a jednotlivých klonů v sadech zastoupených, by měla být identita klonů ověřena.

Výběr klonů, odběr a skladování vzorků

Vlastnímu odběru biologického materiálu předchází výběr klonů. Ten vychází z toho, zda se jedná o namátkovou nebo systematickou kontrolu identity klonů a roubovanců v sadu, nebo zda jde o výběr za účelem identifikace kvalitních klonů na základě požadovaných kritérií, tj. fruktifikace, biometrických charakteristik apod.



Obr. 2: Semenný sad modřínu opadavého č. 87 - Bílovice, MZLU ŠLP Křtiny, polesí Bílovice

Odběr vzorků představuje sběr větví s pupeny v období vegetačního klidu, nejlépe v průběhu února až dubna. Větve s pupeny v počtu alespoň 1 – 3 (borovice) nebo 5 – 15 (modřín) se odebírají buď pouze z roubovanců v daném semenném sadu, nebo také z rodičovských stromů. Nezbytností je důkladné označení a evidence každého vzorku. Tato evidence umožňuje přesně lokalizovat roubovance v daném sadu (nebo rodičovský strom), dobu odběru a vzorkovatele. Do doby zpracování jsou vzorky větví v uzavřených neprodyšných plastových sáčcích uskladněny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky lze takto skladovat po dobu několika měsíců. Po provedení analýz mohou být vzorky archivovány po neomezenou dobu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (obr. 3).



Obr. 3: Dlouhodobé uskladnění vzorků

Analýzy genových markerů

Základem pro testování klonů v semenných sadech ČR s využitím genových markerů jsou v současné době isoenzymové analýzy. Vzorky odebraných pupenů, jejichž počet je dán velikostí pupenů, resp. druhem dřeviny, jsou podrobeny extrakci enzymů homogenizací rostlinného pletiva s extrakčním puřem. Následuje nanesení takto připraveného homogenátu na tenkou vrstvu gelu, kdy je pro dosažení maximální reprodukovatelnosti výsledků provedeno alespoň jedno opakování (celkem dvě analýzy) pro každý z roubovanců, vždy s umístěním porovnávacího standardu na jeden gel. Isoenzymy jsou následně děleny s využitím elektroforézy. Mezi nej-

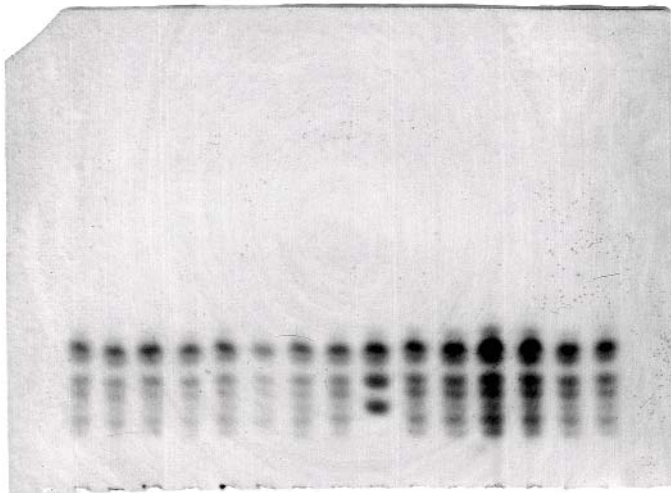
častěji používané metody patří jednorozměrná horizontální elektroforéza na škrobovém anebo jednorozměrná vertikální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu při teplotách 0 – 5 °C , s použitím optimálního pufracího systému (obr. 4).



Obr. 4: Elektroforetická linka pro isoenzymové analýzy

Isoenzymové analýzy se provádějí pro alespoň 6 - 10 polymorfních isoenzymových lokusů. Mezi nejčastěji sledované patří fosfoglucoizomeráza (PGI), glukózo-6-fosfátdehydrogenáza (G-6-PDH), šikimátdehydrogenáza (SDH), aspartátamino-transferáza (AAT), 6-fosfogluconátdehydrogenáza (6-PGDH), malátdehydrogenáza (MDH), fosfoglucomutáza (PGM), leucinaminopeptidáza (LAP) a další, s ohledem na sledovaný druh dřeviny. Primárním experimentálním výstupem jsou zymogramy enzymatických systémů, které představují záznam isoenzymů rozdělených na gelu podle jejich vzájemně odlišné pohyblivosti v elektrickém poli při elektroforéze. Zymogramy jsou pak vyhodnoceny z hlediska identifikace jednotlivých klonů na základě shody či rozdílu mezi zastoupením jednotlivých genetických variant enzymů, resp. lokusů (alel). Základem vyhodnocení elektroforetických záznamů na gelu je relativní porovnání polohy proužků ztmavnutí (oblastí zvýšené optické hustoty), odpovídajících obarveným isoenzymům (pásům), které je provedeno vizuálně, s následnou verifikací pomocí speciálních

počítačových programů. Pásy jsou klasifikovány podle vzestupného pořadí tříd relativní rychlosti migrace. Takto jsou z naskenovaných gelů odečítány referenční hodnoty maxim optické hustoty, odpovídající hodnotě relativní rychlosti migrace a zahrnující detekci pásů (obr. 5).



Obr. 5: Výsledky isoenzymových analýz klonu borovice lesní pro enzym MDH (malátdehydrogenáza). Na 9. pozici je dobře patrný jedinec s odlišným genotypem, ilustrující nehomogenitu tohoto klonu.

Klasifikace pásů na zymogramech je provedena nejprve na jednotlivých gelech a poté je s využitím statistických programů optimalizována v rámci hodnocené skupiny gelů. Výsledky klasifikace jsou zapsány do databáze na základě číselných kombinací alel, které jsou označeny v pořadí podle vzrůstající pohyblivosti v elektrickém poli čísly (0), 1, 2, 3 jako alelické páry (např. 12, 22, 23, atd.), viz příklad v tabulce 1.

Vedle vlastní klasifikace a přiřazení alelických párů měřeným pásům jsou vyhodnocovány alelické frekvence (relativní zastoupení zjištěných alel), heterozygotnost (relativní zastoupení heterozygotních jedinců), genetická vzdálenost a další genetické charakteristiky.

V zájmu maximální spolehlivosti a reprodukovatelnosti výsledků je při odběru vzorků, jejich skladování a vlastní analýze isoenzymů nezbytné používat standardizované postupy, optimálně postupy uznané a schválené v rámci akreditace laboratoře. Pro vybrané klony a roubovance lze doporučit informativní doplnění isoenzymových analýz výsledky sledování proměnlivosti na úrovni DNA a přezkoumání zjištěných rozdílů. Isoenzymové analýzy představují rovněž východisko pro detailní genetické mapování rodových linií ve vybraných sadech (např. metodou mikrosatelitů).

Tabulka 1: Příklad srovnání genetické charakterizace rodičovských stromů a identifikace roubovanců borovice lesní pro případ genetické shody (A) a rozdílů (B). Jsou zvýrazněny odlišné alelické páry u roubovance č. 352, které prokazují, že se tento jedinec geneticky odlišuje od rodičovského stromu i od ostatních roubovanců deklarovaného klonu.

A		Isoenzymové lokusy							
Klon	Roubovanec	G6PDH	SDH_A	PGDH_B	PGM_A	MDH_A	MDH_C	LAP_B	PGI_B
20732	7	22	33	33	22	22	22	22	22
20732	88	22	33	33	22	22	22	22	22
20732	113	22	33	33	22	22	22	22	22
20732	rodič. strom	22	33	33	22	22	22	22	22

B		Isoenzymové lokusy							
Klon	Roubovanec	G6PDH	SDH_A	PGDH_B	PGM_A	MDH_A	MDH_C	LAP_B	PGI_B
20634	100	22	34	23	22	22	12	12	12
20634	126	22	34	23	22	22	12	12	12
20634	352	x	34	33	22	22	12	22	22
20634	rodič. strom	22	34	23	22	22	12	12	12

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Testování identity klonů v semenných sadech s využitím genových markerů představuje ve srovnání s dosavadní praxí v ČR, založenou na administrativní evidenci a dokumentaci principiálně zcela nový postup testování identity semenných sadů. Umožňuje spolehlivou a exaktní identifikaci a verifikaci roubovanců v rámci klonů i ve vztahu k rodičovským stromům, nezávisle na jejich věku (viz příklad v tabulce 1).

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Uvedenou metodiku testování klonů pomocí genových markerů lze použít u již uznaných semenných sadů, perspektivních z hlediska zastoupení klonů (např. reprezentujících autochtonní populaci dané dřeviny) a budoucí využitelnosti jejich reprodukčního materiálu. Lze takto provést genetickou charakterizaci jednotlivých kvalitních roubovanců, vyznačujících se např. vysokou fruktifikací nebo žádanými růstovými parametry.

U nově zakládaných sadů by ověření identity zastoupených klonů mohlo v budoucnu doplnit (legislativou vyžadovanou) dokumentaci potřebnou pro uznání. Metodiku bude možné po ověření a upřesnění aplikovat na další dřeviny.

Zpočátku lze jako účelné doporučit alespoň testování namátkovým způsobem. Pro systematické testování klonů v sadu je vhodnější analyzovat všechny klony a tak charakterizovat celý sad. Optimální je zmapování celého sadu, které však z časových a finančních důvodů není vždy proveditelné v plném rozsahu. V řadě případů je proto výhodnější provedení genetického screeningu všech klonů v sadu, případně doplněné detailním genetickým mapováním kvalitních klonů. Jako genetický screening lze doporučit genetickou charakterizaci alespoň tří náhodně vybraných roubovanců od každého klonu v sadu a jejich porovnání s rodičovskými stromy. Metodiku lze tedy uplatnit jako významnou součást kontroly identity, resp. provenience reprodukčního materiálu. Vlastník sadu, budoucí odběratel osiva i vlastník lesa, ve kterém dojde k zalesnění sadebním materiálem vypěstovaným z osiva z daného sadu, tak budou mít mnohem větší garanci deklarované identity reprodukčního materiálu. Je třeba doporučit specifický a hospodárny přístup ke každému sledovanému sadu, přičemž hlavní úsilí je třeba věnovat eliminaci chyb při zakládání nových semenných sadů i jiných šlechtitelských výsadeb.

DEDIKACE

Metodika vznikla v rámci výzkumného záměru MZe 0002070202 „Šlechtění lesních dřevin a záchrana genových zdrojů cenných a ohrožených populací, včetně využití biotechnologických postupů, metod molekulární biologie a poznatků lesního semenářství v lesním hospodářství“.

Poděkování:

Autoři děkují za jazykovou kontrolu anglického abstraktu a souhrnu W. Keithu Moserovi, Dr.For., CF (U.S. Forest Service, NRS FIA, St. Paul, MN 55108 USA)

LITERATURA

Seznam použité související literatury

- BERGMANN, F., HATTEMER, H. H. (1995): Isozyme loci and their allelic variation in *Pinus sylvestris* L. and *Pinus cembra* L. *Silvae Genetica* 44: 286-289.
- BRUCHÁNIK, R. (2001): Šlachtitelský program borovice lesnej pre pahorkatiny stredného Slovenska. Dizertačná práca. Banská Bystrica, s. 113
- BURIÁNEK, V., IVANEK, O. (2008): ABS of Forest Genetic resources in the Czech Republic. Expert meeting on sectoral Aspects in the International ABS (Access and Benefit Sharing) Regime Brussels, 15th September 2008.
- COLAS, F., BETTEZ, M. (2004): The biggest problems or information needs with respect to tree seed for the province of Québec. *News Bulletin* 40: 3-4.
- EL-KASSABY, Y.A., PRESCHER, F., LINDGREN D. (2007): Advanced generation seed orchards' turnover as affected by breeding advance, time to sexual maturity, and costs, with special reference to *Pinus sylvestris* in Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 22: 88-98.
- FRÝDL, J. (1995): Založení a hodnocení testovacích výsadeb k ověření osiva produkovaného v semenných sadech modřínu. (Establishment and evaluation of testing plantings for verification of European larch seed orchards progeny.) *Zprávy lesnického výzkumu*, 40, č. 3-4: 14-19.
- GÖMÖRY, D., PAULE, L. (1992): Inferences on mating system and genetic composition of a seed orchard crop in the European larch (*Larix decidua* MILL.). *Journal of Genetics and Breeding* 46, č. 4: 309-313.
- CHELIAK, W. M., PITEL, J. A. (1984): Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Inst., Canadian Forestry Service, Agriculture Canada.
- HACKER, M., BERGMANN, F. (1991): The proportion of hybrids in seed from a seed orchard composed of two larch species (*L. europaea* and *L. leptolepis*). *Annales-des-Sciences-Forestieres*. 1991, 48: 631-640
- HERTEL, H. (1997): Biochemisch-genetische Untersuchungen bei Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Hamburg, Hamburg*.
- IVANEK, O. (2003): Isoenzyme analysis of Norway spruce in the Ore Mts. *Comm. Inst. For. Boh.* 20: 95-99.

- IVANEK, O., MARTINCOVÁ, J. (2005): Klonové výsadby smrku ztepilého – izoenzymové analýzy vybraných klonů I. Zprávy lesnického výzkumu 50: 58-60
- IVANEK, O., MARTINCOVÁ, J. (2008): Klonové výsadby smrku ztepilého – izoenzymové analýzy vybraných klonů II. Zprávy lesnického výzkumu 53: 49-54
- KANG, K. S., HARJU, A. M., LINDGREN, D., NIKKANEN, T., ALMQVIST, C., SUH, G. U. (2001): Variation in effective number of clones in seed orchards. *New Forests* 21: 17-33.
- MISIORNY, A., CHALUPKA, W. (2006): Flowering and cone bearing of *Picea abies* grafts in second-generation seed orchards. *Dendrobiology* 56: 51-59.
- OLSSON, T., LINDGREN, D., LI, B. (2001): Balancing genetic gain and relatedness in seed orchards. *Silvae Genetica* 50: 222-227.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J. (1988): Practical Isozyme Genetics – Ellis Horwood series in gene technology. Wiley & Sons, New York.
- PRESCHER, F., LINDGREN, D., EL-KASSABY, Y.A. (2006): Is linear deployment of clones optimal under different clonal outcrossing contributions? *Tree Genetics and Genomes*, 2: 25-29.
- ROSVALL, O., MULLIN, T. J., LINDGREN, D. (2003): Controlling parent contributions during positive assortative mating and selection increases gain in long-term forest tree breeding. *Forest Genetics* 10: 35-53.
- Směrnice pro zakládání semenných porostů a semenných plantáží. (1971). MLVH Praha. 37 s.
- Směrnice pro uznávání a zabezpečení zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin a pro jeho přenos. (1988): 22 s.
- ŠINDELÁŘ, J. (1996): Výhledová studie geneticky vhodného osiva a sadby s ohledem na disponibilní zdroje. (Studie). Jíloviště-Strnady, VÚLHM. 86 s.
- TRÖBER, U., HAASEMANN, W. (2000): Pollination effects in a larch hybrid seed orchard. *Forest Genetics* 7: 77-82.
- VINCENT, G. (1962): Výběr a šlechtění v lesním hospodářství. Praha, SZN. 223 s.
- Vyhláška č. 29/2004 Sb., kterou se provádí zákon č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin. Sbírka zákonů, částka 9: 467-524.
- Zákon č. 149/2003 Sb. o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin lesnický významných druhů a umělých kříženců, určeného k obnově lesa a k zalesňování, a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin). Sbírka zákonů, částka 57: 3279-3294.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- IVANEK, O., FRÝDL, J., NOVOTNÝ, P., KAŇÁK, J. (2008): Czech Republic, towards a seed orchards establishment and management, with especial attention to Scots pine problems. Treebreedex, Activity-N° 5: Scots pine breeding programmes, Wageningen / NL, 6th June 2008.
- IVANEK, O., PROCHÁZKOVÁ, Z. (2006): Identifikace roubovanců a klonů ve dvou semenných sadech modřínu opadavého (*Larix decidua* MILL.). Zprávy lesnického výzkumu 51: 38-43.
- IVANEK, O., PROCHÁZKOVÁ, Z. (2008): Identifikace roubovanců a klonů v semeném sadu Rudíkovy-Albrechtice (nepublikované údaje).
- IVANEK, O., KAŇÁK, J. (2008): Zakládání semenných sadů druhé generace pro borovici lesní. Dílčí technická zpráva projektu. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

VERIFICATION OF IDENTITY AND CLONE TESTING IN PINE AND LARCH SEED ORCHARDS WITH USING GENE MARKERS

Summary

Seed orchards in the Czech Republic developed from clonal outplantings based on individual selection. They were established using grafts of parent trees and represent synthetic populations with a diverse genetic origin. There are several levels of genetic diversity in the seed orchards. Phenotypic qualitative traits are investigated with the aid of morphology whereas the quantitative characteristics are studied by use of gene markers, especially isozymes and DNA. In this paper, we present a methodology for verification of graft identity and clonal homogeneity and their comparison with parent trees of *Pinus* and *Larix*. This methodology deals with using isozyme analysis to investigate genetic diversity at the enzymatic level. The effectiveness of the methodology results from variability of isozyme loci and is characterized by combination of alleles differentiated according to electrophoretic mobility. This method enables identification and verification of clones and grafts in relationship with the parent trees; in some seed orchards, isozyme analysis showed a significant number of erroneously-assigned grafts. The isozyme analysis was based on electrophoretic separation of constituents of biological material from sampled dormant buds. They were carried out for 6 - 10 polymorphic loci and the results are then evaluated in order to genetically identify individual clones and grafts. In the interest of maximum reproducibility of the results, sampling, the analysis and evaluation are carried out by using validated and certified procedures. Clonal identification in seed orchards using isozyme analyses represents a new methodology of genetic identification in the Czech Republic.