

ZHODNOCENÍ SEMENNÉHO SADU LÍPY SRDČITÉ POMOCÍ MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

EVALUATION OF SMALL-LEAVED LIME SEED ORCHARD USING MICROSATELLITE MARKERS

PAVLÍNA MÁCHOVÁ ✉ - HELENA CVRČKOVÁ - OLGA TRČKOVÁ

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

✉ e-mail: machova@vulhm.cz

ABSTRACT

The Simple Sequence Repeats (SSR) method of DNA analyses was used to clonal identification of trees in a model lime (*Tilia cordata* Mill.) seed orchard. Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from young leaves taken from 377 sampled trees of the seed orchard. Samples were screened using selected eight polymorphic nuclear microsatellite markers. Measuring of the size of amplification products was carried out using the genetic analyser Applied Biosystems 3500. The obtained data were analysed by statistical programs CERVUS, GenAlEx 6.503. There were detected 79 different alleles at 8 loci in the 377 lime individuals from seed orchard. By applying of the 8 suitable markers to the 38 clones from model seed orchard we obtained multilocus genotypes (MLG). The obtained results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual genotypes identification. 93.6 % of the sampled trees could be assigned to the clones represented in the seed orchard. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic and could be further used for clonal identification of lime trees.

For more information see Summary at the end of the article.

Klíčová slova: lípa srdčitá; klonální identita; mikrosatelity; semenný sad

Key words: lime trees; clonal identity; microsatellites; seed orchard

ÚVOD

Lípa srdčitá je dřevina rozšířená téměř po celé Evropě s výjimkou nejjižnějších a nejsevernějších oblastí kontinentu. V České republice se vyskytuje roztroušeně po celém území. Hlavní stanoviště lípy srdčité je na suťových svazích, kde roste často ve společnosti javorů, jasanu ztepilého, dubu zimního, habru a v lužních lesích na územích mimo dosah dlouhotrvajících záplav (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Nejvýše položené lokality výskytu v ČR se nacházejí asi v 600 m n. m. (předhůří Šumavy), v Evropě se ale lípy vyskytují i v nadmořské výšce 1500 m, a to v centrálních Alpách (JENSEN 2003). Lípa srdčitá se vyznačuje velkou přizpůsobivostí ke klimatickým činitelům. Jedná se o druh, který je tolerantní vůči suchu (JAEGERE et al. 2016). Jde o polostinnou až stinnou dřevinu, skromnou v nárocích na světlo i teplotu stanoviště. Dobře snáší kontinentální klima, s čímž souvisí její dobrá odolnost vůči mrazu. V době letních extrémních přísušků předčasně shazuje listy. Je poměrně rezistentní vůči chorobám a škůdcům a do určité míry snáší i imisní zátěž (BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2018). Jako druh upřednostňuje hluboké a mírně vlhké humózní půdy s neutrální, případně alkalickou

půdní reakcí, v půdě preferuje vyšší obsah vápníku. U lípy srdčité se projevuje vysoká schopnost regenerace vegetativní cestou pomocí pařezových či kořenových výmladků (RADOGLAU et al. 2008), která je vyšší v porovnání s lípou velkolistou (LOGAN et al. 2015). Vegetativní množení u lípy je využíváno častěji než generativní, téměř 100 % sazeň produkovaných v severovýchodní Evropě bylo získáváno vegetativní cestou (CISTYAKOVA 1982).

Na území České republiky se semenné sady začaly zakládat již v roce 1956 (MUSIL et al. 2007). V současné době je zde evidováno 101 uznaných (platných) semenných sadů, přičemž těch nejvíce uznaných s platnou registrací je pro borovici lesní (24). Pro lípu srdčitou jsou v současnosti registrovány 4 platné semenné sady. Semenné sady jako účelové výsadby podléhají aktuálně platným právním předpisům týkajícím se využívání reprodukčního materiálu lesních dřevin (zákon č. 149/2003 Sb.). Národní legislativa je v souladu i se směrnicí Rady 1999/105/ES, o uvádění reprodukčního materiálu lesních dřevin na trh, kterou je Česká republika jako členský stát Evropské unie povinna respektovat. V této směrnici je zakotvena i povinnost členských

států vybudovat funkční kontrolní systém reprodukčního materiálu lesních dřevin, pro nějž lze využívat i molekulárně-genetické metody, které aplikují například v SRN (BEHM, KONNERT 2002; KONNERT 2006, 2011; KONNERT et al. 2006; KOTRLA et al. 2008). Problematika identifikace roubovanců a klonů v semenných sadech a klonových výsadbách lesních dřevin pomocí molekulárních analýz byla řešena i v ČR, a to např. pomocí izoenzymových analýz (IVANEK et al. 2013), nově pak pomocí analýz mikrosatelitových markerů (MÁCHOVÁ et al. 2014, 2017).

Genetickou skladbu organismů a jejich variabilitu na úrovni populací a jedinců lze stanovit pomocí DNA markerů, které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Pro získání informací o genetické proměnlivosti studovaných jedinců je nutné vyhledat vysoce polymorfni DNA markery, např. SSR (mikrosatelitové) markery. Mikrosatelity byly poprvé popsány a využity v humánní medicíně (LITT, LUTY 1989; TAUTZ 1989), jejich využití se dále rozšířilo i pro studium dalších organismů a v současnosti metoda SSR markerů patří mezi standardní molekulárně genetické techniky. Mikrosatelitové markery jsou s úspěchem využívány pro identifikaci jedinců, a jsou tedy vhodné i pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin (semenných sadů, archivů klonů a směsí klonů).

MATERIÁL A METODIKA

V populační genetice a ve šlechtění rostlin nacházejí stále širší uplatnění DNA analýzy využívající mikrosatelitové markery. Vzhledem ke kodominantnímu charakteru v kombinaci s velkým počtem variabilních alel se SSR markery dají využít i pro identifikaci klonů a kultivarů rostlin a také pro mapování genomů (HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003). Mikrosatelitové markery jsou vhodné i pro rozlišení druhů a hybridů u lesních dřevin (BACILIERI et al. 1996), vykazují vysokou úroveň diverzity a dovolují kvantifikovat genetickou strukturu populací (LOGAN et al. 2015).

Ověřování klonové identity bylo provedeno na semenném sadu lípy srdčité – CZ-3-3-LP-138-10-4-C (dle evidence ERMA2 – ÚHŮL) o rozloze 1,68 ha. Jedná se o uznaný semenný sad nacházející se v lokalitě Písecká Smoleč, který byl založen v roce 1996. Při výsadbě v něm bylo evidováno 400 roubovanců (ramet) od 38 klonů (ortetů) lípy srdčité z rodičovských stromů.

Rostlinný materiál (mladé listy) byl odebrán v dubnu 2014 (100 vzorků), dále byl proveden odběr v květnu 2018 (248 vzorků) a v červnu 2018 (37 vzorků) a následně byl proveden verifikující odběr na jaře 2019 (54 vzorků). Vzorky byly odebrány z 377 rostoucích jedinců v semenném sadu. Při odběru byl rostlinný materiál označen, uložen v mikrotenových sáčkách do chladicích boxů a po převozu do laboratoře ihned zpracován. Část vzorků byla zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a část lyofilizována. Pro izolaci DNA byl použit lyofilizovaný rostlinný materiál třený s tekutým dusíkem. Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle dodaného protokolu (DNeasy® Plant Handbook). Množství a kvalita vyzolované DNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoPhotometr (Implen).

Na základě provedené literární rešerše bylo pro testování vytipováno 13 (SSR) lokusů původně vyvinutých pro *Tilia platyphyllos* (PHUEKVILAI, WOLFF 2013). Pro prvotní testování primerů bylo použito 20 vzorků ze semenného sadu lípy srdčité. Testování polymerázové řetězové reakce (PCR) proběhlo se specifickými primery k markerům Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc11, Tc31, Tc915, Tc918, Tc920, Tc937, Tc943, Tc951 a Tc963. Pro získání amplifikačních produktů testovaných lokusů byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce. PCR reakce probíhaly v termocyklerech Veriti Thermal cycler. Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů bylo provedeno po proběhlé elektroforéze na 2% agarózových gelech v $0,5 \times$ TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B. V.) s využitím GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Na základě vyšší polymorfnosti a dobré zhodnotitelnosti výsledků bylo pro další analýzy vybráno 8 polymorfních lokusů. Použité primery a jejich sekvence jsou uvedeny v tab. 1. Z testovaných lokusů byly podle velikostí sledovaných alel vytvořeny pro následné fragmentační analýzy dva multiplexy. Multiplex 1 obsahuje lokusy Tc4, Tc6, Tc920 a Tc937, multiplex 2 obsahuje lokusy Tc5, Tc7, Tc915 a Tc963.

Pro každý vzorek u obou multiplexů probíhala PCR v celkovém objemu $15\ \mu\text{l}$ a reakce byla provedena s použitím polymerázy Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) a s ní dodanými komponenty. Reakční směs pro PCR je u obou multiplexů totožná a obsahuje: $1,5\ \mu\text{l}$ 10xPCR Buffer minus Mg, 2 mM MgCl_2 , 0,133 mM směs dNTPs, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, specifické primery k uvedeným lokusům (v multiplexu 1 v koncentracích 0,1 μM k lokusům Tc4, Tc6 a 0,05 μM k lokusům Tc920, Tc937, v multiplexu 2 byly specifické primery k lokusům Tc5, Tc7, Tc915 a Tc963 v koncentraci 0,1 μM) a templátovou DNA v rozmezí 12,5–40,5 ng/ μl .

Tab. 1.

SSR lokusy a sekvence primerů
SSR loci and sequence of the primers

Lokus/Locus	Forward primer	Reverse primer	
Multiplex 1	Tc4	ATTTAGAATGCCAACCTGCTAAG	TATTGAAGTCCATTTCCAATTGTC
	Tc6	CCATATCTTCTGCCAGTTTTCC	GGACTAATTTCTTCTTTTATTAGGC
	Tc920	AAATGTCTTCAGAGTGACTAGATGG	TGCCTCATTATTCTCCTAATTCTC
	Tc937	AGCCAACCAACTTTTACAATACAG	AGATAAAAGCACATAAATCGATGG
Multiplex 2	Tc5	TTTTCATACATTTAGAGACTTTTAGCA	TGCATGATTTGTATGTTTAGGG
	Tc7	TTTACTTTTGCCAGTTGTGAGG	CACCTAGAATGCCTCCTATTCCG
	Tc915	ACATCGATTGTATTTCCCTTAAAC	GTTGTATTTTGCCCTTAACATTG
	Tc963	CTAACCCCACTTCTTTAATTCTG	GCTTTCATTTTCAGTTTTCTCTAG

V tabulce 2 je uveden teplotní režim PCR reakce, který je pro oba multiplexy shodný, na závěr byly testované vzorky chlazeny na 4 °C.

Pro fragmentační analýzu byly PCR reakce provedeny s fluorescenčně označenými primery (6FAM, VIC, NED, PET) a u získaných amplifikačních produktů byla provedena fragmentační analýza na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500. Před fragmentační analýzou byla provedena denaturace, ke každému vzorku bylo přidáno 11 µl Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a 0,4 µl velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ' Size standard v 2.0, Applied Biosystems). Po inkubaci 4 minuty při teplotě 94 °C byly vzorky rychle zchlazeny na ledu. Odečtení velikostí fragmentů probíhalo na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500. Hodnocení jejich velikostí bylo provedeno pomocí softwarového programu GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems).

Pro posouzení genetických charakteristik sledovaných jedinců lípy srdčité a určení klonové identity byla získaná data mikrosatelitových markerů zpracována pomocí statistických programů GenAlix 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) a CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007).

VÝSLEDKY

Pro testování vzorků lípy srdčité bylo použito 8 mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus a výsledky jejich analýz byly interpretovatelné. Amplifikační produkty sledovaných lokusů u analyzovaných vzorků dosahovaly velikosti v rozmezí 213–236 bp u markeru Tc4; 124–142 bp u markeru Tc6; 220–234 bp u markeru Tc920; 146–168 bp u markeru Tc937; 136–176 bp u markeru Tc5; 215–231 bp u markeru Tc7; 147–179 bp u markeru Tc915; 239–279 bp u markeru Tc963.

Pomocí statistického programu CERVUS byly pro použité lokusy stanoveny hodnoty počtu alel, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, počty heterozygotů a stanoven polymorfní informační obsah (tab. 3). U sledovaných 377 jedinců byl průměrný počet alel na lokus 9,875, průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,7252 a průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu (Polymorphism Information Content, PIC) 0,6902. Vzhledem ke skutečnosti, že markery jsou klasifikovány jako informativní, pokud hodnota PIC je $\geq 0,5$ (SHARMA et al. 2010), jsou markery Tc937 (PIC = 0,423) a Tc7 (PIC = 0,386) málo informativní. Odchytky od Hardy-Weinbergovy

Tab. 2.

Průběh optimalizovaných PCR pro vybrané SSR markery
Stages of optimized PCR for the selected SSR markers

Krok/Step	Počáteční denaturace/ Initial denaturation		Počet cyklů/ Number of cycles	Denaturace/ Denaturation		Annealing		Elongace/Elongation		Finální elongace/ Final elongation	
	T (°C)	Čas		T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (s)	T (°C)	Čas (min)
	95	5 min	15	95	15	54	15	72	15	72	20
			20	98	20	52	20	72	20		

Tab. 3.

Parametry genetické diverzity 377 jedinců ze semenného sadu lípy srdčité pro použitých 8 mikrosatelitových markerů
Genetic diversity parameters for the working set of 8 microsatellite loci applied to 377 sampled lime trees of seed orchard

Lokus/Loci	k	H _o	H _e	Počet heterozygotů/ Number of heterozygotes	PIC	HW	F (null)
Tc4	9	0,483	0,674	182	0,643	***	0,1428
Tc5	13	0,812	0,815	306	0,793	***	-0,0007
Tc6	10	0,801	0,794	302	0,764	ns	-0,0050
Tc7	3	0,531	0,504	200	0,386	ns	-0,0273
Tc915	14	0,915	0,850	345	0,831	***	-0,0389
Tc920	6	0,772	0,808	291	0,779	***	0,0188
Tc937	7	0,435	0,446	164	0,423	ns	0,0118
Tc963	17	0,589	0,912	222	0,707	***	0,2168

k = Počet různých alel/Number of different alleles

H_o = Heterozygotnost pozorovaná/Observed heterozygosity

H_e = Heterozygotnost očekávaná/Expected heterozygosity

PIC = Polymorfní informační obsah/Polymorphism information content

HW = Signifikantnost odchytky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy/Significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium

(ns = není signifikantní/not significant, *** = signifikantní na 0,1% úrovni/significant at the 0.1% level)

F(null) – Odhadovaná frekvence nulových alel dle van Oosterhouta/Estimated null allele frequency (according to van Oosterhout)

rovnováhy při aplikaci Bonferroniho korekce nebyly u lokusů Tc6, Tc937 a Tc7 signifikantní, u ostatních lokusů byly odchylky signifikantní na hladině významnosti $P < 0,001$. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) u celkového souboru 377 jedinců byla nejvyšší u lokusu Tc915 (0,915), nejvyšší hodnota očekávané heterozygotnosti (0,912) byla u lokusu Tc963. Stupeň polymorfismu stanovený hodnotou PIC

byl zjištěn nejnižší (0,386) u lokusu Tc7 a nejvyšší (0,904) u lokusu Tc963. U všech vzorků byly nalezeny maximálně 2 alely pro zkoumané lokusy, což potvrzuje diploidní charakter lípy srdčité, $2n=2x=82$ (PIGOTT 2012). Pomocí fragmentační analýzy 8 lokusů u sledovaných 377 jedinců semenného sadu byly získány multilokusové genotypové profily (MLG). V tab. 4 jsou uvedeny multilokusové genotypové profily

Tab. 4.

Multilokusové genotypy (MLG) zkoumaných ortetů
Multilocus genotypes (MLG) of tested ortets

Klon	Multiplex 1				Multiplex 2			
	Tc4	Tc6	Tc920	Tc937	Tc5	Tc7	Tc915	Tc963
9393	219/226	130/140	222/228	148/148	136/146	215/227	149/163	255/255
9394	224/232	130/140	228/230	148/148	136/146	215/227	149/155	263/279
9395	232/232	130/130	220/228	148/148	140/166	215/215	153/155	265/265
9396	226/234	138/140	222/230	148/148	136/140	215/227	149/155	257/265
9397	232/232	134/136	230/232	148/148	136/140	215/227	149/173	267/271
9398	224/224	130/136	230/230	148/148	136/140	215/227	149/149	257/265
9399	226/234	132/140	228/230	148/148	146/146	227/227	149/153	245/275
9400	224/226	130/136	220/230	148/148	140/166	215/215	155/167	275/275
9401	226/226	136/138	222/230	148/158	136/136	215/227	147/155	239/267
9402	226/234	124/138	222/222	148/148	136/146	215/227	169/169	255/267
9403	213/226	124/136	222/222	148/158	140/156	227/227	157/169	245/265
9404	226/232	124/134	228/228	150/158	136/146	215/227	149/157	255/263
9405	224/226	124/136	222/222	148/148	136/140	227/227	157/169	245/263
9406	234/234	134/140	222/222	148/148	146/160	215/215	149/169	269/277
9407	226/226	136/138	220/234	148/148	136/160	215/227	149/169	251/265
9408	226/226	124/138	222/222	148/158	136/140	227/227	153/169	255/255
9409	226/226	130/134	232/234	148/148	146/158	215/227	153/175	277/277
9410	226/226	130/138	228/230	148/150	140/176	215/215	153/155	251/271
9411	224/226	130/138	228/230	148/156	144/166	215/227	153/155	251/257
9412	234/234	136/136	230/234	148/150	136/136	215/215	155/169	259/269
9413	226/234	134/136	220/230	148/150	136/136	215/227	149/169	269/269
9414	226/226	136/136	220/230	148/148	136/140	227/227	153/155	251/267
9415	226/226	134/136	220/230	150/158	136/140	215/227	169/177	251/271
9416	232/232	130/130	220/230	148/148	136/166	227/227	155/173	267/267
9417	224/226	136/140	230/230	150/150	146/172	215/227	155/163	251/263
9418	213/226	136/138	228/234	148/148	136/148	215/227	149/157	261/265
9419	226/232	126/130	232/234	148/148	136/154	215/227	153/153	253/261
9420	226/226	138/138	228/234	148/150	148/148	215/227	167/169	263/263
9421	226/226	130/136	232/234	146/148	136/148	227/227	157/169	267/267
9422	226/232	136/136	230/234	148/158	140/146	215/227	149/179	261/277
9423	226/226	130/136	234/234	148/158	146/164	215/227	149/167	261/261
9424	226/232	136/136	232/232	148/148	140/148	227/227	149/157	265/265
9425	226/232	136/138	230/234	148/148	146/156	215/227	153/155	245/245
9426	226/226	130/140	232/234	148/148	140/146	227/227	149/149	273/273
9427	226/226	130/136	228/230	148/168	156/160	227/231	149/169	263/263
9428	236/236	130/136	222/230	148/166	140/154	215/215	157/163	245/263
9429	226/230	130/136	222/230	146/166	136/146	227/227	149/169	267/267
9430	217/226	136/142	220/234	148/148	146/164	215/227	149/153	251/251

zkoumaných klonů (ortetů) zastoupených v semenném sadě. U sebraných 38 klonů byla shoda všech zkoumaných genotypů (jedinců, ramet) potvrzena u 14 klonů. U 16 klonů byl nalezen 1 odlišný genotyp přiřaditelný k jinému klonu v rámci SS a u 4 klonů byly nalezeny 2 odlišné genotypy, ale bylo možné je přiřadit k jinému klonu (ortetu) v rámci SS. U 10 klonů bylo identifikováno 14 unikátních genotypů nezařaditelných v rámci semenného sadu.

U hodnocených 377 jedinců ze semenného sadu pak bylo celkově detekováno 79 rozdílných alel v 8 lokusech. Nejvíce polymorfní se jevil lokus Tc963 u kterého bylo identifikováno 17 rozdílných alel u sledovaného souboru vzorků, a nejméně polymorfní byl lokus Tc7, u něhož byly detegovány pouze 3 alely. Privátní alely byly zjištěny u ortetů 9394, 9399, 9409, 9410, 9417 a 9428, a to u lokusů Tc4, Tc5, Tc6 a Tc963. Pomocí statistického programu GenALEX 6.503 byly zjištěny průměrné hodnoty Shannonova informačního indexu pro jednotlivé sledované lokusy, které se pohybovaly od 0,436 (lokus Tc937) do 0,883 (lokus Tc915). Podle kvalitativní interpretace hodnot Fst (WRIGHT 1943) byla mezi některými sledovanými klony zjištěna velmi vysoká genetická divergence (0,600 mezi klony 9395 a 9420), ale např. mezi klony 9430 a 9425 byla zjištěna hodnota Fst 0,069, tedy malá genetická divergence.

Shoda genotypových profilů jedinců u sledovaných klonů byla při použití osmi SSR markerů potvrzena v 37 % případů, v 42 % byl odlišný 1 roubovanec a v 10 % (4 ortety) byla detekována neshoda ve více než 1 rameti. Ve zkoumaném souboru bylo možné 23 roubovanců přiřadit k příslušným ortetům (došlo tedy k jejich chybnému označení), lze proto konstatovat, že z celkových 377 zkoumaných jedinců jich 363 (96,3 %) lze přiřadit k ortetům zastoupeným v rámci semenného sadu.

DISKUSE

Analýzy mikrosatelitových markerů mají široké uplatnění v populační genetice a ve šlechtění rostlin. Analýza SSR markerů se jeví jako vhodná metoda pro identifikaci variet u většiny kulturních druhů rostlin (PAN 2010) i dřevin (ROBICHAUD et al. 2006). Využití jaderných mikrosatelitových markerů pro identifikaci klonů, druhů a zjištění genetické diference a variability u lípy popsali např. HANSEN et al. (2014), LOGAN et al. (2015, 2019), JAEGERE et al. (2016), LOBO et al. (2018). Pro identifikaci klonů u lípy využili SSR markery i BROECK et al. (2018) a WOLFF et al. (2019). V naší studii jsme pro molekulární analýzy semenného sadu lípy srdčité využili polymorfní jaderné mikrosatelitové (SSR) markery popsané v práci PHUEKVILAI a WOLFF (2013). Patnáct v této studii popsaných markerů bylo vyvinuto původně pro lípu velkolistou, z toho 12 markerů se amplifikuje i u dalších 23 druhů rodu *Tilia*. Použité lokusy byly využity pro populační studie, rozlišování druhů lip, ale vzhledem k vysoké polymorfnosti byly vhodné i pro identifikaci klonové identity.

Pro testování vzorků lípy srdčité ze zkoumaného semenného sadu jsme použily 8 otestovaných mikrosatelitových markerů, které vykazovaly polymorfismus a výsledky jejich analýz byly interpretovatelné. HANSEN et al. (2014) použili pro prvotní identifikaci klonové identity jedinců lípy srdčité v královských zahradách Dánska 5 mikrosatelitových markerů. WOLFF et al. (2019) ve své studii lip nacházejících se v alejích a parcích ve Velké Británii, Estonsku, Německu, Belgii a Holandsku použili pro genotypizaci 17 SSR markerů, ale pro jednoznačnou druhovou a klonovou identifikaci bylo dostačující využít 11 SSR markerů. LOGAN et al. (2015) využili pro charakteristiku 27 populací lípy srdčité a velkolisté ve Velké Británii 13 SSR markerů, u markerů totožných s markery v naší studii zjistili u populací lípy srdčité 101 rozdílných alel, v našem souboru vzorků jsme určili 79 alel. Největší rozdíl v počtech zjištěných alel se projevil u vysoce polymorfního lokusu Tc963 (26 u britských populací a 17 v našem souboru vzorků). Lokusy Tc4 a Tc915 byly polymorfnější u vzorků v naší studii a naopak málo polymorfní lokus Tc7 (3 alely) byl u britských populací zastoupen 8 rozdílnými alelami. V případě sledování genetické

diverzity u 16 evropských populací lípy srdčité, zahrnující populace z Dánska, Francie, Finska, Švédska, Norska, Velké Británie, Ruska, Rakouska, Německa, České republiky a Polska zjistili LOGAN et al. (2019) průměrný počet alel pro 12 SSR markerů 13,7 (v rozmezí 2–35 alel pro jednotlivé lokusy), v naší studii byl průměrný počet alel na lokus 9,875 (v rozmezí 3–17). Hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e) byly v britské studii LOGAN et al. (2015) v rozmezí 0,41 (Tc937)–0,86 (Tc963), u našich sledovaných vzorků byly hodnoty H_e v rozsahu 0,446 (Tc937)–0,912 (Tc963). Privátní alely nebyly v britském souboru vzorků detegovány u lokusů Tc6 a Tc937, v našem souboru vzorků se u lokusu Tc6 privátní alely objevily u 2 klonů. Ve studii LOBO et al. (2018) zaměřené na izolované populace lípy srdčité ve 4 eko-geografických regionech Dánska byly zjištěny průměrné hodnoty H_e v jednotlivých regionech v rozsahu 0,60–0,66. Pro 16 populací lípy srdčité na území Velké Británie byly zjištěny průměrné hodnoty H_e 0,51 (LOGAN et al. 2015). V případě evropských populací sledovaných ve studii LOGAN et al. (2019) byla průměrná hodnota H_e pro populace nacházející se v centrální části rozšíření lípy srdčité 0,573, u populací z okrajových částí výskytu byla průměrná hodnota H_e 0,553. Průměrná hodnota H_e pro sledované klony v naší studii byla 0,412. LOGAN et al. (2015) zjistili mezi populacemi lípy srdčité ve Velké Británii hodnoty Fst v rozmezí 0,305–0,454, LOBO et al. (2018) mezi 4 oblastmi s dánskými populacemi lípy srdčité zjistili hodnoty Fst v rozmezí 0,014–0,037, tedy malé hodnoty genetické divergence. V případě srovnání klonů v naší studii byly hodnoty Fst v rozmezí 0,069–0,6.

V populacích lípy srdčité se často vyskytují vegetativně namnožení jedinci, v mnoha studiích byly pomocí SSR markerů identifikovány klony. LOGAN et al. (2019) uvádí, že u 16 analyzovaných populací lípy srdčité byli nalezeni 2–3 klonově shodní jedinci u 6 populací, vzdálenost mezi jednotlivými klonově shodnými stromy byla v průměru 22 m. V naší sledovaném semenném sadu nebyly u zkoumaných ortetů zjištěny shodné genotypové profily, tedy výchozí rodičovské stromy byly unikátní. Pomocí mikrosatelitových markerů určovali kultivary lípy využívané pro městské aglomerace WOLFF et al. (2019). BROECK et al. (2018) uvádějí, že v severozápadní Evropě jsou v městské zástavbě nejvíce rozšířeny pouze 2 kultivary (klony), což potvrzují analýzami mikrosatelitových markerů.

Využití DNA analýz při výběru stromů do šlechtitelských programů se v případě lípy srdčité jeví jako velmi užitečný doplňkový šlechtitelský nástroj, např. provedením analýz SSR markerů je možné vyřadit klonově shodné jedince při zakládání semenných sadů, případně vyloučit hybridní jedince.

ZÁVĚR

U osmi mikrosatelitových lokusů (Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc915, Tc920, Tc937 a Tc963) vykazovaly amplifikační produkty polymorfismus, byly interpretovatelné, a proto byly užity ke studiu klonové identity vybraného semenného sadu. Na základě molekulárních dat zjištěných ze souboru 377 jedinců ze semenného sadu byly získány statistické charakteristiky 8 mikrosatelitových markerů. Celkově bylo detekováno 79 rozdílných alel v 8 lokusech. Nejvíce polymorfní se jevil lokus Tc963, u kterého bylo identifikováno 17 rozdílných alel. Na základě provedených analýz byly stanoveny multilokusové genotypové profily (MLG) jednotlivých klonů lípy srdčité v semenném sadu Písecká Smoleč. Shoda genotypových profilů jedinců u sledovaných klonů byla při použití osmi SSR markerů potvrzena v 37 % případů. V analyzovaném souboru bylo možné 363 roubovanců přiřadit k příslušným ortetům, tedy 96,3 % ramet bylo možné přiřadit ke ortetům zastoupených v semenném sadě.

Poděkování:

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118.

LITERATURA

- BACILIERI R., DUCOUSSO A., KREMER A. 1996. Comparison of morphological characters and molecular markers for the analysis of hybridization on sessile and pedunculate oak. *Annales des Sciences Forestières*, 53: 79–91. DOI: 10.1051/forest:19960106
- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- BROECK A. VANDEN, COX K., MELOSİK I., MAES B., SMETS K. 2018. Genetic diversity loss and homogenization in urban trees: the case of *Tilia x europaea* in Belgium and the Netherlands. *Biodiversity and Conservation*, 27: 3777–3792. DOI: 10.1007/s10531-018-1628-5
- BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2018. Metodická příručka k určování domácích druhů lip. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 47 s. Lesnický průvodce 9/2018.
- CISTYAKOVA A.A. 1982. Biologičeskije osobennosti vegetativnogo vozobnovienia osnovnyh porod v širokolistvennyh lesach. *Lesovedenie*, 2: 11–17.
- HANSEN O.K., THOMSEN P., RASMUSSEN CH.W. 2014. DNA markers provide insight about common lime in historical plantings – An example from the Royal Danish Gardens. *Urban Forestry & Urban Greening*, 13: 534–552. DOI: 10.1016/j.ufug.2014.04.001
- HORMAZA J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321–328.
- IVANEK O., PROCHÁZKOVÁ P., MATĚJKA K. 2013. Analysis of the genetic structure of a model Scots pine (*Pinus sylvestris*) seed orchard for development of management strategies. *Journal of Forest Science*, 59: 377–385.
- JAEGERE T. DE, HEIN S., CLAESSENS H. 2016. A review of the characteristics of a small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) and their implications for silviculture in a changing climate. *Forest*, 7 (3): 56. DOI: 10.3390/f7030056
- JENSEN J.S. 2003. EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use for lime (*Tilia* spp.). Rome, Italy, International Plant Genetic Resources Institute: 6 s.
- 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., FOFFOVÁ E., FOFF V. 2006. Možnosti kontroly identity lesného reprodukčného materiálu genetickými metódami. In: Sarvaš M., Sušková M. (eds.): Aktuálne problémy lesného škôlkárstva, semenárstva a umelej obnovy lesa. 22. – 23. 3. 2006, Liptovský Mikuláš. Zvolen, Národné lesnícke centrum: 69–74.
- KONNERT M. 2006. Proof of identity of forest reproductive material based on reference samples. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt der Forst- und Holzwirtschaft (BFH)*, 221: 61–71.
- KONNERT M. 2011. Certification of forest reproductive material based on reference samples and genetic methods. In: Applied Forestry Research in the 21st Century. International conference held on the occasion of the 90th anniversary of the Forestry and Game Management Research Institute. Book of abstracts. Prague-Průhonice, Sept. 13–15, 2011. Jiloviště, Forestry and Game Management Research Institute: 58.
- KOTRLA P., PAŘÍZEK M., CAFOUREK J. 2008. Kontrola identity RM pomocí genetických markerů. *Lesnická práce*, 87: 622–623.
- LITT M., LUTY J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397–401.
- LOBO A., HANSEN O.K., HANSEN J.K., ERICHSEN E.O., JACOBSEN B., KJÆR E.D. 2018. Local adaptation through genetic differentiation in highly fragmented *Tilia cordata* populations. *Ecology and Evolution*, 8: 5968–5976. DOI: 10.1002/ece3.4131
- LOGAN S.A., PHUEKVILAI P., WOLFF K. 2015. Ancient woodlands in the limelight: delineation and genetic structure of ancient woodland species *Tilia cordata* and *Tilia platyphyllos* (Tiliaceae) in the UK. *Tree Genetics & Genomes*, 11: 52. DOI: 10.1007/s11295-015-0872-z
- LOGAN S.A., PHUEKVILAI P., SANDERSON R., WOLFF K. 2019. Reproductive and population genetic characteristics of leading-edge and central populations of two temperate forest tree species and implications for range expansions. *Forest Ecology and Management*, 433: 475–486. DOI: 10.1016/j.foreco.2018.11.024
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. 2014. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého. *Zprávy lesnického výzkumu*, 59 (4): 243–249.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., POKORNÁ E., TRČKOVÁ O. 2017. Hodnocení semenného sadu třešně ptačí s využitím mikrosatelitových markerů. *Zprávy lesnického výzkumu*, 62 (4): 271–278.
- MUSIL J., NOVÁK P., ŠEFL J. 2007. Semenné sady v České republice. In: Aktuálne problémy lesného škôlkárstva, semenárstva a umelej obnovy lesa. Zborník referátov z medzinárodného seminára, ktorý sa konal 27.–28. marca 2007 v Liptovskom Jáne. Zvolen, Národné lesnícke centrum: 37–43.
- PAN Y.-B. 2010. Databasing molecular identities of Sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1: 87–94.
- 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.
- PHUEKVILAI P., WOLFF K. 2013. Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species. *Applications in Plant Sciences*, 1 (4): 1200386. DOI: 10.3732/apps.1200386
- PIGOTT C.D. 2012. Lime-trees and basswoods. A biological monograph of the genus *Tilia*. Cambridge, Cambridge University Press: 395 s. DOI: 10.1017/CBO9781139033275
- RADOGLOU K., DOBROWOLSKA D., SPYROGLOU G., NICOLESCU V.N. 2008. A review on the ecology and silviculture of limes (*Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop. and *Tilia tomentosa* Moench.) in Europe. *Bodenkultur*, 60 (3): 9–19.
- ROBICHAUD R.L., GLAUBITZ J.C., RHODES O.E. JR., WOESTE K. 2006. A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. *New Forests*, 32: 179–196. DOI: 10.1007/s11056-005-5961-7
- SHARMA M.V., KANTARTZI S.K., STEWART J.M. 2010. Molecular diversity and polymorphism information content of selected *Gossypium hirsutum* accessions. In: Oosterhuis D.M. (ed.): Summaries of Arkansas cotton research 2009. Fayetteville, Arkansas Agricultural Experiment Station: 124–127. Research Series 582.

- SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.
- TAUTZ D. 1989. Hypervariability of a simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463–6471. DOI: 10.1093/nar/17.16.6463
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 366 s.
- WOLFF K., HANSEN O.K., COUCH S., MOORE L., SANDER H., LOGAN S.A. 2019. *Tilia* cultivars in historic lime avenues and parks in the UK, Estonia and other European countries. *Urban Forestry & Urban Greening*, 43: 126346. DOI: 10.1016/j.ufug.2019.05.008
- WRIGHT S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.

EVALUATION OF LIME SEED ORCHARD USING MICROSATELLITE MARKERS

SUMMARY

The clonal identification in model seed orchard of small-leaved lime was studied by DNA analyses using the Simple Sequence Repeats (SSR) method. Microsatellites (SSR) are highly variable markers that are commonly used in population genetic studies for analyses of gene flow, parentage analyses, and studies of genetic diversity. In particular nuclear simple sequence repeat (SSR) markers have proven to be extremely useful for characterizing cultivars and identifying clones (HORMAZA 2002; SCHUELER et al. 2003; PAN 2010; JÄGERE et al. 2016; HANSEN et al. 2014; LOGAN et al. 2015, 2019; LOBO et al. 2018; BROECK et al. 2018; WOLFF et al. 2019). Total genomic DNA was extracted by DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) from leaves taken from 377 sampled lime trees of seed orchard. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized for the tested primers that have been scanned in publication (PHUEKVILAI, WOLFF 2013) (Tab. 1, 2). Eight polymorphic nuclear microsatellite markers (Tc4, Tc5, Tc6, Tc7, Tc915, Tc920, Tc937 and Tc963) were selected, and specific primers were fluorescently labelled. Measurement of the size of amplification products was carried out on the genetic analyser Applied Biosystems 3500. The obtained data were analysed by means of the statistical programs CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) and GenAlEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012). Altogether 79 different alleles were detected at 8 loci of the 377 lime individuals from seed orchard, i.e. 9.875 alleles per locus in average. The most polymorphic locus over our set of samples was locus Tc963, the number of different alleles was estimated to 17. By applying of the 8 suitable markers to the 38 clones from model seed orchard we obtained multilocus genotypes (MLG) shown in Tab. 4. Table 3 shows number of alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity, number of heterozygotes, Polymorphism Information Content (PIC), significance of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and estimated null allele frequencies (according to van Oosterhout) of loci. Allelic richness (number of alleles) at each locus ranged from 3 to 17. Expected heterozygosities ranged between 0.446–0.912 across all loci and observed heterozygosities ranged from 0.435 to 0.915, Polymorphism Information Content (PIC) ranged from 0.386 to 0.904. The mean PIC value for eight selected loci was 0.6902.

These results illustrate the utility of the microsatellite loci for assessing spatial patterns of genetic diversity and for individual identification. The identified genetic loci were verified as highly polymorphic, and could be further used for clonal identification of lime trees. 93.6% of the sampled trees could be assigned to clones represented in the seed orchard.

The application of SSR markers could be an important tool for population genetics and breeding of lime, for example it would be possible to unequivocally identify with unique DNA fingerprints all suitable genotypes for the establishment of a seed orchard.

Zasláno/Received: 8. 11. 2019

Přijato do tisku/Accepted: 9. 12. 2019