VYUŽITÍ DNA MARKERŮ PRO KONTROLU DEKLAROVANÉHO PŮVODU REPRODUKČNÍHO MATERIÁLU SMRKU ZTEPILÉHO

USE OF DNA ANALYZES FOR VERIFYING THE DECLARED ORIGIN OF NORWAY SPRUCE REPRODUCTIVE MATERIAL

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 purpose of this study was to investigate the possibilities of using objective methods of DNA analysis to verify the declared origin of reproductive material of Norway spruce in terms of the Czech Republic. Monitoring of the identity of reproductive material was carried out during three years, i.e., from seed collection to transplanted plants production. Reference samples from the 32 sets of reproductive material were obtained, analyses of microsatellite markers were performed, and the genetic compositions of sets were compared after statistical processing. Altogether, DNA analyses were performed on 1920 samples of plant material from 8 selected sources of forest reproductive material (units of forest reproductive material). Seven optimally polymorphic markers with sufficient informative value were selected for the subsequent evaluation of the genetic structure of the monitored sets of Norway spruce reproductive material by Bayesian clustering. Using the performed Structure analysis, the obtained profiles of 8 monitored units of reproductive material (4 sample sets from one units) of different origin were distinguishable from each other. Thus, these methodological procedures could be used in the state control systems to certify the origin of forest reproductive material and increase consumer protection of forest owners and nursery production in the Czech Republic.

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

Klíčová slova: smrk ztepilý; původ reprodukčního materiálu; genetická diverzita; mikrosatelity

Key words: Norway spruce; origin of forest reproductive material; genetic diversity; microsatellites

ÚVOD

Umělá obnova lesa zůstává v rámci České republiky převažujícím způsobem obnovy. Na rozdíl od zemědělství se v lesním hospodářství pracuje většinou s původními druhy (a částečně dosud i populacemi) lesních dřevin a jednou z hlavních podmínek úspěšné umělé obnovy je použití sadebního materiálu vhodného původu. Zajištění této podmínky je spojené s potřebou evidovat horizontální i vertikální přenos reprodukčního materiálu (RM) lesních dřevin, s cílem udržet vysokou a kvalitní hospodářskou produkci a zajistit ochranu přirozeného genofondu domácích populací. V lesním hospodářství ČR dochází každoročně k pohybu značného množství RM lesních dřevin a i z tohoto důvodu je nutné, aby oprávněné státní orgány měly k dispozici účinné metody, kterými lze podpořit či vyloučit deklarovaný původ. V souvislosti se vstupem ČR mezi členské země ES byla do národní legislativy transponována směrnice Rady 1999/105/ES do zákona č. 149/2003 Sb. (ve znění pozdějších předpisů). Každá členská země EU je povinna vytvořit kontrolní systém k zajištění zachování pravdivé identity (informace o původu) daného oddílu RM od jeho získání až po dodávku konečnému spotřebiteli (Malá et al. 2013). Velká část sadebního materiálu pěstovaného v lesních školkách pochází z osiva z lesních porostů, což jsou zpravidla přirozené populace s vysokou genetickou diverzitou (kdy navíc je genetická struktura konkrétního oddílu osiva podle roku sběru jiná), a to je i důvodem, proč je současný evropský systém garance původu RM lesních dřevin postaven na principu pravidelných úředních kontrol v kombinaci s povinností vedení evidencí. Vývoj biochemických a molekulárních metod genetické analýzy dřevin otevřel v této složité problematice kontroly identity lesního RM nové možnosti, např. kontrola RM lesních dřevin na bázi molekulárně-genetických metod je základem zavedeného systému ZüF-Verfahren (Behm, Konnert 2002; Konnert, Behm 2006;

Konnert 2011) využívaného v Německu. V ČR je stávající systém kontroly odkázán na přísný dohled zaměřený na evidenci a kontrolu pohybu RM (Kotrla, Paříze k 2008; Procházková 2008). Jeho nedostatkem je nemožnost dokázat případné porušení právních předpisů objektivní metodou, která by umožnila ověření skutečného původu vybraného vzorku RM lesních dřevin.

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 polymorfní DNA markery, např. mikrosatelitové (SSR) 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. Vzhledem ke kodominantnímu charakteru v kombinaci s velkým počtem variabilních alel se SSR markery dají využít pro identifikaci klonů a kultivarů rostlin a také pro mapování genomů (Hormaza 2002). Mikrosatelitové markery jsou vhodné i pro rozlišení druhů a hybridů u lesních dřevin (Bacilieri et al. 1996), vykazují vysokou úroveň diverzity a jsou vhodné pro populační genetické studie (Scotti et al. 2008; Verbylaitè et al. 2017). Cílem práce bylo na základě analýz DNA s využitím vybraných mikrosatelitových markerů ověřit úroveň genetické rozmanitosti, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik u vybraných vzorků RM smrku ztepilého, zjistit genetickou strukturu a podobnost sledovaných oddílů RM a ověřit vhodnost metodiky pro sledování identity RM u smrku ztepilého.

MATERIÁL A METODIKA

V provedené studii byly pro podmínky ČR ověřeny možnosti využití DNA analýz pro sledování identity RM smrku ztepilého v různých fázích zpracování od sběru semenného materiálu až po dopěstování sadebního materiálu. DNA analýzy byly provedeny u 1920 vzorků rostlinného materiálu z 8 zdrojů reprodukčního materiálu (uznaných jednotek, UJ). Odběry referenčních vzorků z oddílů (UJ) byly realizovány v průběhu 3 let. Sběry semenného materiálu probíhaly z 35–60 stromů uznaných porostů. V průběhu zpracování semenné suroviny bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků semen ze šišek před zpracováním a 60 vzorků z osiva po vyluštění, při následné produkci sadebního materiálu v poloprovozních podmínkách bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků z produkce semenáčku a 60 vzorků ze školkovaných sazenic. Přehled oddílů RM a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků je uveden v tab. 1.

Izolace DNA z rostlinného materiálu (klíční rostlinky, semena, semenáčky a mladé výhony z jednotlivých sazenic) byla provedena pomocí soupravy (kitu) DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN (Qiagen, Hilden, Germany). Výchozí navážka rostlinného materiálu byla pod 100 mg u zamražených vzorků a 20 mg u lyofilizovaných vzorků. Koncentrace a kvalita izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky přístrojem Nanophotometer (Implen). Genetické parametry zkoumaných souborů vzorků byly získány na základě fragmentačních analýz mikrosatelitových lokusů. Byly provedeny optimalizace podmínek polymerázových řetězových reakcí (PCR) s příslušnými primery, a to u 26 zvolených mikrosatelitových markerů, jejichž sekvence byly vyhledány na základě studia literárních zdrojů (Pfeiffer et al. 1997; Scotti et al. 2000, 2002; Rungis et al. 2004; Fluch et al. 2011; Melnikova et al. 2012). Optimalizované postupy PCR amplifikace poskytovaly reprodukovatelné jednoznačné velikosti alel studovaných lokusů. Na základě výsledků provedeného primárního vyhodnocení genetických dat získaných pomocí testovaných markerů bylo pro potřeby nastavení metodického postupu kontroly deklarovaného původu RM vybráno 7 optimálně polymorfních markerů s dostatečnou vypovídací hodnotou (PAAC23, SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03). Amplifikace s ohledem na velikost alel a charakter reakčních podmínek PCR probíhaly ve 2 multiplexech, pouze marker WS0023.B03 měl vlastní specifickou sestavu PCR parametrů. Primery pro PCR byly fluorescenčně označeny (6FAM, VIC, NED, PET). Amplifikační reakce každého lokusu obsahovala 1 µl templátové DNA (≈10–50 ng/µl). V rámci prvního multiplexu byla provedena amplifikace lokusů PAAC23, SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F13. PCR pro multiplex 1 a pro lokus WS0023.B03 probíhala pro každý vzorek v celkovém objemu 15 µl s použitím polymerázy Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) a s dalšími komponenty, 1,5 µl 10xPCR pufr, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, koncentrace specifických forward i reverse primerů byla 0,1 µM k lokusům SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F13 a 0,2 µM k lokusům PAAC23, WS0023.B03. Sterilní ultračistou vodou (Sigma – Aldrich) byla reakční směs doplněna do objemu 15 µl. Teplotní profil PCR byl 3 minuty 94 °C pro počáteční denaturaci, následovalo 37 cyklů se střídáním teplot 94 °C, 55 °C (annealingová teplota), 72 °C, perioda každé teploty byla 45 sekund. Amplifikace byla zakončena teplotou 72 °C po dobu 20 minut. Teplotní profil PCR pro lokus WS0023.B03 byl 94 °C, trvající 5 minut pro počáteční denaturaci, následovalo 35 cyklů se střídáním teplot 94 °C 50 sec., 62 °C (annealingová teplota) 50 sec., 72 °C 105 sekund. Finální elongační fáze probíhala při teplotě 72 °C po dobu 15 minut. Složení PCR reakčních komponent pro společnou amplifikaci dalších dvou lokusů WS0022.B15, WS0073.H08 (druhý multiplex) bylo odlišné od reakční směsi prvního multiplexu pouze v koncentraci 0,067 mM směsi dNTPs. Teplotní profil PCR byl 94 °C, trvající 5 minut pro počáteční denaturaci, následovalo 35 cyklů se střídáním teplot 94 °C 45 sec., 58 °C (annealingová teplota) 40 sec., 72 °C 45 sekund. Finální elongační fáze probíhala při teplotě 72 °C po dobu 15 minut. Amplifikace byly provedeny v teplotním cyklovači Veriti thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR produkty byly podle jejich velikosti separovány kapilární elektroforézou na genetickém analyzátoru Applied Biosystem 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Velikosti alel v hodnotách párů bází byly odečteny pomocí softwarového programu GeneMapper®4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s využitím velikostního standardu GeneScanTM 600LIZ® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), který je přidáván ke každému vzorku pro stanovení kalibrační křivky. Pro zhodnocení genetických parametrů souboru vzorků byla data mikrosatelitových lokusů statisticky zpracována s využitím programů GenAlEx 6.501 (Peakall, Smouse 2006, 2012) a CERVUS (Kalinowski et al. 2007). Parametry genetické diverzity byly: počet rozdílných alel, Shannonův informační index, hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti, fixační index (F), který byl kalkulován jako F = 1 – (Ho/He) podle Wrighta (1965), Neiovy standardní genetické vzdálenosti (Nei 1972), analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis, PCoA), míry vzájemné genetické diferenciace pomocí koeficientu inbreedingu (F_{ST}) a odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pro možnost porovnání populační struktury sledovaných souboru vzorků s využitím multilokusových genetických dat byla použita Bayesianská metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007; Hubisz et al. 2009). Nastavené parametry v softwaru byly směsný model, korelované alelické frekvence, 10 000 Length of Burn-in Period, 100,000 Markov chain Monte Carlo (MCMC), počet klastrů (K) od 1 do 10, každý s deseti opakováními. Vzhledem k nízkým hodnotám F_{ST} (vzájemné diferenciace mezi porosty) byl nastaven model Lock prior. Optimální hodnota K (počet klastrů) byla zjištěna pomocí programu STRUCTURE HARVESTER (Earl, Holdt 2012).

Tab. 1.
Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků smrku ztepilého
Overview of forest reproductive material sources and designation of Norway spruce sample sets

Původ/Proof						
Označení oddílu/Designation of forest reproductive mateial source	ČUJ/Source of forest reproductive material	rok zrání/ maturation year	Přírodní lesní oblast/ Natural Forest Areas	Lesní vegetační stupeň/ Forest vegetation zone	fáze odběru vzorku/sampling phase	označení souboru vzorků/ designation of sample set
1	CZ-2-2A-SM-0004-36-3-Z	2017	3. LVS	36 – Středomoravské Karpaty	šišky po sběru/collected cones	SM_1A_SIS
					osivo po vyluštění/seed after processing	SM_1B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_1C_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_1D_SAZ
2	CZ-2-2A-SM-00010-17-3-E	2017	3. LVS	17 – Polabí	šišky po sběru/collected cones	SM_2A_SIS
					osivo po vyluštění/seed after processing	SM_2B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_2C_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_2D_SAZ
3	CZ-2-2A-SM-00002-8-3-S	2017	3. LVS	8 – Křivoklátsko	šišky po sběru/collected cones	SM_3A_SIS
					osivo po vyluštění/seed after processing	SM_3B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_3C_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_3D_SAZ
4	CZ-2-2A-SM-03411-38-5-Z	2017	5. LVS	38 – Bílé Karpaty a Vizovické vrchy	šišky po sběru/collected cones	SM_4A_SIS
					osivo po vyluštění/seed after processing	SM_4B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_4C_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_4D_SAZ
5	CZ-2-2A-SM-03546-31-4-E	2017	4.LVS	31 – Českomoravské mezihoří	šišky po sběru/collected cones	SM_5A_SIS
					osivo po vyluštění/seed after processing	SM_5B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_5C_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_5D_SAZ
6	CZ-2-2A-SM-03379-40-5-T-G185	2017	5. LVS	40 – Moravskoslezské Beskydy	šišky po sběru/collected cones	SM_6A_SIS
					osivo po vyluštění/seed after processing	SM_6B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_6C_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_6D_SAZ
8	B-SM-56+4-25-6-RK	1995	6. LVS	25 – Orlické hory	osivo po vyluštění/seed after processing	SM_8B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_8C_SEM
					semenáčky ve školce/nursery seedlings second variant	SM_8C_OPO_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_8D_SAZ
10	CZ-2-2A-SM-3134-25-7-H	2006	7. LVS	25 – Orlické hory	osivo po vyluštění/seed after processing	SM_10B_OSI
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	SM_10C_SEM
					semenáčky ve školce/nursery seedlings second variant	SM_10C_OPO_SEM
					školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	SM_10D_SAZ

VÝSLEDKY

U sledovaných 32 souborů vzorků smrku ztepilého původem z 8 oddílů (UJ) byly na základě analýz 7 mikrosatelitových lokusů získány genetické parametry. Vzorky byly odebírány v průběhu zpracování semenné suroviny a při následné produkci sadebního materiálu v poloprovozních podmínkách z jednotlivých sledovaných oddílů. Byly hodnoceny hladiny genetické diverzity, heterozygotnosti a genetické vzdálenosti hodnocených skupin vzorků a genetická strukturalizace pro možnost porovnání skupin příslušných oddílů (UJ; tab. 1). Vybrané mikrosatelitové markery poskytovaly po optimalizaci amplifikačních podmínek jednoznačné a reprodukovatelné velikosti lokusů u jednotlivých hodnocených stromů. Rozmezí velikostí alel u sledovaných lokusů a jejich další genetické charakteristiky jsou uvedeny v tab. 2. Počty alel u studovaných lokusů, získaných analýzami 1920 vzorků, se pohybovaly od 8 do 34, což potvrzuje dostatečnou až vyšší hladinu polymorfismu jak vybraných markerů, tak sledovaných souborů. Nejvíce polymorfní byl lokus WS0023.B03, nejméně WS0073.H08. Hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e), představující podíl očekávaných heterozygotů za předpokladu Hardy-Weinbergovy rovnováhy, se pohybovaly od 0,68 do 0,92 a nejvyšší hodnoty dosáhly lokusy WS00111.K13, WS0023.B03, WS00716.F13. Pozorovaná četnost heterozygotů (H_o) u sledovaných markerů se pohybovala v intervalu od 0,51 u lokusu WS0023.B03 do 0,88 u lokusu WS00716.F13. Další zhodnocení genetické diverzity vyjádřené pomocí Shannonova informační indexu (I) v sobě odráží i rovnoměrnou distribuci alelových frekvencí. Hodnoty se pohybovaly od 1,3 v lokusu WS0073.H08 do 2,75 v lokusu WS0023.B03. Pomocí statistického programu CERVUS byl pro použité lokusy stanoven polymorfní informační obsah (tab. 2). U sledovaných 1920 jedinců byla průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu (Polymorphism Information Content, PIC) 0,8432. Vzhledem ke skutečnosti, že markery jsou klasifikovány jako informativní, pokud hodnota PIC je ≥ 0,5 (Sharma et al. 2010), všechny použité markery byly informativní.

Významné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy ($P < 0.001$), založené na výpočtech chí-kvadrát testu se ukázaly v lokusu WS0023.B03 ve všech 32 sledovaných souborech s výjimkou SM_2A_SIS a SM_6A_SIS. V lokusu WS00111.K13 byly významné odchylky nalezeny v 6 souborech vzorků, v lokusu SPAG2 byly významné odchylky nalezeny ve 3 souborech vzorků, v lokusu WS0022.B15 ve 2 souborech vzorků a v lokusech PAAC23, WS00716.F13 a WS0073.H08 v jednom souboru vzorků.

Genetické charakteristiky 32 sledovaných souborů vzorků jsou uvedeny v tab. 3. Ohodnocení genetické diverzity průměrným počtem různých alel ze všech analyzovaných mikrosatelitových lokusů bylo mezi soubory vyrovnané (13,857–16,857). Průměrný počet efektivních alel se pohyboval od 5,563 (SM_ 6A_SIS) do 9,796 (SM_2C_SEM). Genetická diverzita dle Shannonova indexu se ve sledovaných souborech vzorků pohybovala ve vyšších hodnotách, a to od 1,961 (SM_6A_SIS) do 2,371 (SM_2C_SEM). Privátní alely byly zjištěny pouze u 2 vzorků souboru SM_10B_OSI. U sledovaných souborů vzorků byla zjištěna 100% polymorfnost sledovaných lokusů. Pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) byla procentuálně určena diferenciace mezi sledovanými soubory a mezi jedinci sledovaných souborů v programu GenAlEx 6.503. Diferenciace mezi jednotlivými soubory byla 4 %, mezi sledovanými vzorky (jedinci) 10 %. Podle kvalitativní interpretace hodnot F_{ST} (Wright 1943), hodnotící vzájemné genetické diferenciace (Pairwise Population Fst Values) mezi sledovanými soubory vzorků, byly při zjištěných hodnotách od 0,003 do 0,038 dosaženy malé genetické diferenciace. Genetické vzdálenosti mezi soubory vzorků byly kalkulovány na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (Nei 1972) a jsou graficky znázorněny pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis – PCoA) na obr. 1. Vzdálenosti mezi 8 sledovanými soubory vzorků (oddíly) se pohybovaly v rozmezí 0,04–0,325. Genetické vzdálenosti souborů vzorků u jednotlivých oddílů (UJ) měly hodnoty 0,04–0,136. Rozdíly genetických profilů mezi 8 sledovanými soubory vzorků byly dále ověřovány analýzou Structure z alelických dat jednotlivých vzorků. Optimální počet klastrů byl stanoven pomocí Evannovy metody na K = 2 na základě nejvyšší hodnoty delta K, druhá alternativa při mírně nižší hodnotě delty K soubory vzorků strukturovala do 8 odlišných skupin (obr. 2). Pro možnost posouzení strukturování oddílů RM formou

Tab. 2.
Charakteristiky mikrosatelitových lokusů získaných z 32 zkoumaných souborů vzorků smrku ztepilého
Characteristics of selected nuclear microsatellite loci across 32 investigated Norway spruce sample sets

Lokus/Locus	Sekvence primerů (5´–3´)/ Primer sequence (5´–3´)	Rozmezí velikostí PCR produktů/PCR product size range (bp)	k	Na	I	H_o	H_e	F	PIC
PAAC23	F: TGTGGCCCCACTTACTAATATCAG R: CGGGCATTGGTTTACAAGAGTTGC	266–312	22	10,9	1,69	0,74	0,71	-0,03	0,709
$SpAG_2$	F: GCTCTTCACGTGTACTTGATC R: TTCGAAGATCCTCCAAGATAC	89–121	19	15,4	2,43	0,84	0,89	0,06	0,909
WS00716.F13	F: TCAAGTAATGGACAAACGATACA R: TTTCCAATAGAATGGTGGATTT	208–248	24	17,5	2,58	0,88	0,91	0,03	0,925
WS0022.B15	F: TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG R: TGGCTTTTTATTCCAGCAAGA	172–212	20	14,6	2,15	0,83	0,82	-0,01	0,831
WS0073.H08	F: TGCTCTCTTATTCGGGCTTC R: AAGAACAAGGCTTCCCAATG	196–220	8	5,5	1,3	0,7	0,68	-0,015	0,647
WS00111.K13	F: GACTGAAGATGCCGATATGC R: GGCCATATCATCTCAAAATAAAGAA	211–271	28	20,9	2,74	0,8	0,92	0,13	0,941
WS0023.B03	F: AGCAGCTGGGGTCAAAGTT R: AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG	168–240	34	22,3	2,75	0,51	0,91	0,44	0,94

k: počet alel/number of allele in each locus; Na: průměrný počet různých alel/average different alleles number; I: Shannonův informační index/Shannon's information index; H_o: heterozygotnost pozorovaná/observed heterozygosity, H_e: heterozygotnost očekávaná/expected heterozygosity, F: fixační index/fixation index

grafického výstupu bylo jako optimální vybráno 8 klastrů. Jednotlivé stromy všech souborů vzorků byly zastoupeny ve všech klastrech, ale s různým poměrem jejich zastoupení. Struktura klastrů byla pro každý oddíl odlišná. U souborů vzorků (A – D) patřící k oddílu 1 měl převahu žlutý klastr (34,9–59,8 %), u souborů vzorků oddílu 2 měl převahu červený klastr (49,2–69,3 %), u souborů vzorků oddílu 3 byl nejvíce zastoupený zelený klastr (42,3–48,6 %). V souborech vzorků oddílu 4 převažoval hnědý klastr (59–72,3 %), u souborů vzorků oddílu 5 byl nejvíce zastoupen modrý klastr (36,3–42,7 %) a částečně světle modrý klastr (16,7–26 %), v souborech vzorků oddílu 6 byl růžový klastr v podílech 62–79,5 % a v souborech vzorků oddílu 8 měl převahu okrový klastr (42,1–66,6 %). U souboru vzorků oddílu 10 bylo zjištěno zastoupení modrého klastru v podílech 32,4–60 % a okrového klastru v podílech 11,2–31,5 %. Získané profily 8 sledovaných oddílů (UJ) rozdílného původu byly mezi sebou odlišitelné.

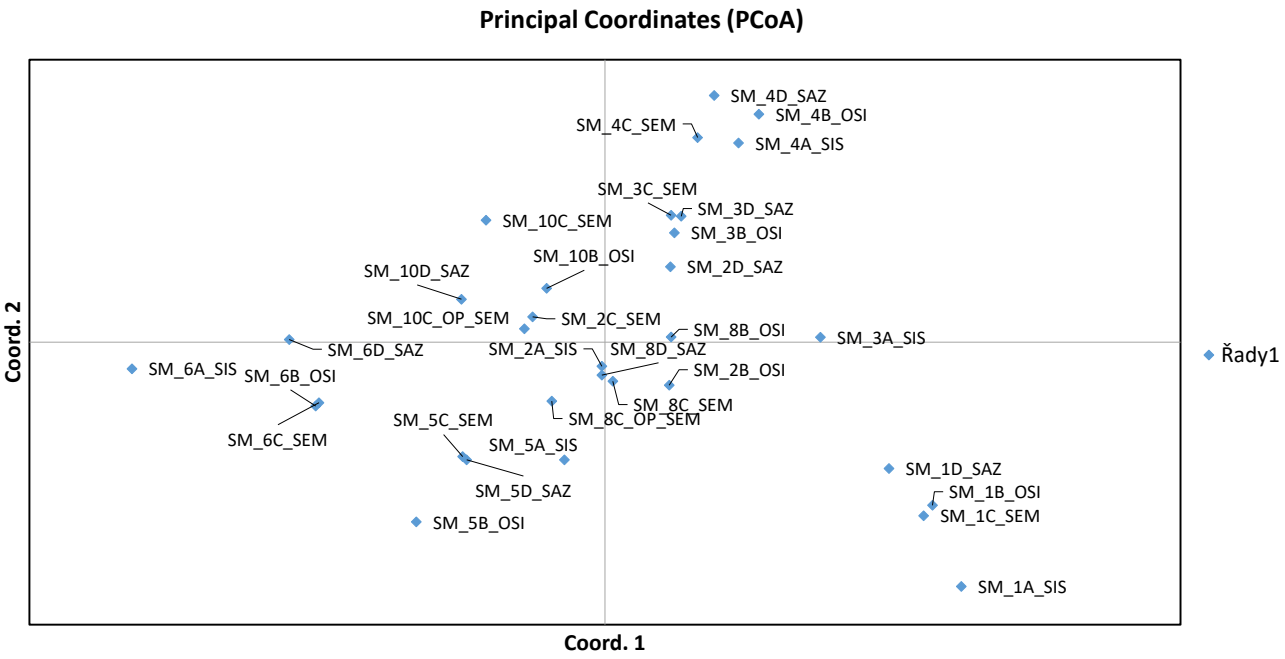
DISKUSE

Analýza mikrosatelitových markerů má široké uplatnění v populační genetice a ve šlechtění rostlin, jedná se o vhodnou a široce využívanou metodu pro identifikaci variet u většiny kulturních druhů rostlin (Pan 2010) i dřevin (Robichaud et al. 2006). Mikrosatelitové markery pro studium genetické struktury a diverzity smrkových porostů již uplatnila řada autorů (Scotti et al. 2000, 2006, 2008; Rungis et al. 2004; Meloni et al. 2007; Tollefsrud et al. 2009; Fluch et al. 2011;

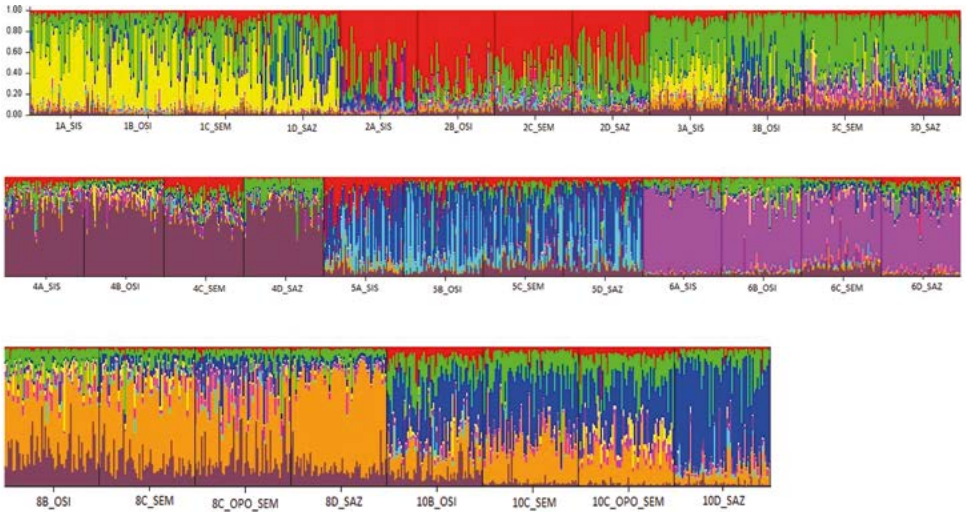
Tab. 3.
Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro 32 sledovaných souborů vzorků smrku ztepilého
Mean values for genetic characteristics of 32 investigated Norway spruce sample sets

Soubory vzorků/ Sample sets	Na	Ne	I	H_o	H_e	F
SM_1A_SIS	14,000	6,842	2,084	0,752	0,807	0,056
SM_1B_OSI	15,286	7,642	2,193	0,774	0,829	0,058
SM_1C_SEM	15,143	8,543	2,232	0,767	0,833	0,073
SM_1D_SAZ	15,000	7,985	2,223	0,709	0,836	0,136
SM_2A_SIS	16,286	8,654	2,300	0,812	0,850	0,041
SM_2B_OSI	15,429	9,523	2,312	0,763	0,850	0,098
SM_2C_SEM	16,286	9,796	2,371	0,774	0,863	0,094
SM_2D_SAZ	16,857	8,515	2,303	0,723	0,846	0,135
SM_3A_SIS	15,143	8,199	2,206	0,769	0,819	0,051
SM_3B_OSI	16,000	9,349	2,314	0,724	0,849	0,138
SM_3C_SEM	15,286	8,356	2,206	0,738	0,824	0,095
SM_3D_SAZ	16,000	8,691	2,274	0,774	0,842	0,068
SM_4A_SIS	15,143	8,410	2,222	0,750	0,835	0,085
SM_4B_OSI	15,571	8,190	2,192	0,750	0,812	0,058
SM_4C_SEM	15,571	8,624	2,246	0,752	0,837	0,091
SM_4D_SAZ	13,857	7,628	2,133	0,769	0,819	0,040
SM_5A_SIS	15,000	8,403	2,211	0,729	0,831	0,112
SM_5B_OSI	16,000	8,272	2,201	0,741	0,815	0,083
SM_5C_SEM	15,429	9,142	2,250	0,757	0,828	0,076
SM_5D_SAZ	15,000	8,798	2,277	0,774	0,846	0,079
SM_6A_SIS	13,857	5,563	1,961	0,769	0,787	0,019
SM_6B_OSI	14,571	7,145	2,140	0,766	0,824	0,064
SM_6C_SEM	15,429	7,796	2,201	0,779	0,834	0,063
SM_6D_SAZ	14,857	7,353	2,152	0,795	0,824	0,029
SM_8B_OSI	15,000	9,639	2,301	0,812	0,855	0,041
SM_8C_SEM	15,571	8,885	2,287	0,774	0,850	0,075
SM_8C_OP_SEM	14,714	9,201	2,255	0,751	0,841	0,096
SM_8D_SAZ	14,857	7,706	2,197	0,712	0,833	0,137
SM_10B_OSI	15,571	9,321	2,343	0,743	0,864	0,130
SM_10C_SEM	15,714	9,028	2,305	0,705	0,854	0,170
SM_10C_OP_SEM	15,571	9,726	2,351	0,799	0,861	0,064
SM_10D_SAZ	15,429	8,613	2,289	0,689	0,856	0,195

Na: počet různých alel/number of different alleles; Ne: počet efektivních alel/number of effective alleles; I: Shannonův informační index/Shannon's information index; H_o: heterozygotnost pozorovaná/observed heterozygosity; H_e: heterozygotnost očekávaná/expected heterozygosity; F: fixační index/fixation index



Obr. 1.
Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA)
Fig. 1.
Results of the principal coordinate analysis (PCoA)



Obr. 2.
Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro K = 8 u 32 sledovaných souborů vzorků
Fig. 2.
Evaluation of genetic structure by Bayesian method for K = 8 in 32 observed sample sets

Unger et al. 2011; Nowakowska et al. 2014; Cvjetković et al. 2017; Verbylaitė et al. 2017). Mikrosatelitové markery využili pro studium genetické diverzity u stanovišť smrku ztepilého s rozdílným managementem v Itálii Piotti et al. (2018). Pro zjištění genetické diferenciace mezi jedinci smrku ztepilého s rozdílnými typy koruny nacházející se v horských oblastech Srbska (Golija) využili Galović et al. (2015) 16 mikrosatelitových markerů. Genetickou diverzitu u subpopulací smrku ztepilého z rozdílných nadmořských výšek v oblasti Kalwang (Rakousko) sledovali pomocí jaderných a chloroplastových mikrosatelitů Maghuly et al. (2006). Caré et al. (2020) využili mikrosatelitové markery pro rodičovskou analýzu, sledování šíření pylu a toku genů u autochtonní populace smrku ztepilého v Thuringenském lese (Německo) využívané pro sběr osiva. Podobně i Shimono et al. (2010) využili 8 SSR markerů pro sledování efektivity sprášení a vliv vzdálenosti doletu pylu u osiva získaného z potomstev jedinců v klonovém archivu ve Švédsku.

Využití biochemických markerů pro možnost kontroly identity RM lesních dřevin v průběhu procesu získávání sadebního materiálu je základem zavedeného systému ZüF-Verfahren (Behm, Konnert 2002; Konnert, Behm 2006) využívaného v Německu. Tento systém je založen na získávání a uchovávání referenčních vzorků, které umožňuje průběžné i následné porovnávání oddílů RM a dále na výběru vhodných molekulárních metod a markerů. Uvedený systém byl zpočátku nastaven na využívání izoenzymových markerů, které byly později nahrazeny markery s vyšší rozlišovací schopností (nEST- PCR markery, SSR markery). Pro možnost kontroly identity oddílů RM jsou vhodné markery vykazující spíše střední genetickou variabilitu, ale jsou dostatečně variabilní na úrovni sledovaných souborů (Konnert, Behm 2006).

V naší studii bylo na základě zhodnocení provedených analýz u 1920 vzorků pomocí 26 testovaných mikrosatelitových markerů vybráno 7 markerů s odpovídající výpovědní hodnotou: PAAC23, SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03. EST-SSR markery WS00111.K13, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03 využil ve studii zaměřené na sledování genetické diverzity a struktury pěti autochtonních populací smrku ztepilého v Srbsku Stojnić et al. (2019). V případě uvedené studie se v souboru 150 jedinců nejvíce polymorfní jevil lokus WS00111.K13 (29 alel) a dále lokus WS0023.B03 (26 alel), v námi analyzovaných 1920 vzorcích byl nejvíce polymorfní lokus WS0023.B03 (34 alel), jako nejméně polymorfní byl shodně vyhodnocen lokus WS0073.H08. I pomocí uvedených SSR markerů sledovali Cvjetkovič et al. (2017) variabilitu mezi založenými 4 testy potomstev v Bosně a Hercegovině, ve studii využili 11 mikrosatelitových markerů pro genetickou charakterizaci 360 jedinců pocházejících z 6 rozdílných populací. Pozorovaná heterozygotnost se v těchto sledovaných populacích pohybovala v hodnotách 0,61–0,68, v našich souborech byly tyto hodnoty v rozmezí 0,689–0,850. Hodnoty očekávané heterozygotnosti se v populacích v Bosně a Hercegovině pohybovaly v rozmezí 0,63–0,71, v našich souborech byly hodnoty vyšší (0,787–0,864). Vyšší úroveň hodnot očekávané heterozygotnosti zjištěné v našich souborech vzorků (v průměru 0,863) odpovídaly hodnotám, jež zjistila Nowakowska et al. (2014) v porostech smrku ztepilého v Polsku (0,853). Stanovené hodnoty Shannonova informačního indexu byly v našich souborech vzorků 1,961–2,371. Bínová et al. (2020) ve své studii genetické struktury rozdílných ekotypů smrku ztepilého v České republice využili 11 SSR markerů, mezi nimi i WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03, PAAC23 a SpAG2. V souboru 450 analyzovaných jedinců bylo zjištěno nejvíce alel u lokusu PAAC23 (36) a nejméně u lokusu WS0073.H08 (7), v naší studii jsme u lokusu PAAC23 zjistili 22 alel a u lokusu WS0073.H08 shodně nejméně alel (8). Hodnota pozorované heterozygotnosti u sledovaných 3 ekotypových skupin byla 0,601, tedy nižší než u našeho souboru vzorků (0,857). Shimono et al. (2010) použili pro genetickou charakterizaci 50 klonů v klonovém archivu smrku ztepilého i marker SpAG2, u tohoto lokusu detegovali 15 alel a hodnota pozorované heterozygotnosti H_o byla 0,88, což je srovnatelné s naším zjištěním (19 alel a H_o 0,84). Stejný lokus použili pro studium genetické diverzity u 10 rozdílných proveniencí smrku ztepilého v Polsku i Klisz et al. (2019), v souboru 495 stromů zjistili u lokusu SpAG2 23 rozdílných alel a dále Androsiuk et al. (2013), kde v souboru 456 jedinců smrku ztepilého z 9 populací ve Švédsku detegovali u tohoto lokusu 21 alel.

Wojnicka-Półtorak et al. (2013) sledovali pomocí izoenzymových markerů změny genetické struktury a diverzity u věkově rozdílných skupin populace smrku ztepilého v Bělověžském pralese, pomocí 26 markerů zjistili snížení hodnot pozorované heterozygotnosti u dospělých jedinců v porovnání se semenáčky. Při porovnání našich věkově rozdílných skupin (osivo – semenáčky – sazenice) nebyly statisticky významné změny v hodnotách pozorované heterozygotnosti zjištěny.

Bínová et al. (2020) pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) zjistili 3% varianci mezi sledovanými skupinami a 23% mezi jedinci smrku ztepilého v ČR, u námi sledovaných souborů vzorků byla zjištěna 4% variabilita mezi jednotlivými soubory a mezi jedinci 10%. Klisz et al. (2019) při sledování genetické diverzity u 10 rozdílných proveniencí smrku ztepilého v Polsku zjistili variabilitu mezi sledovanými proveniencemi pouze 1%, podobně též Androsuik et al. (2013) mezi 9 populacemi ve Švédsku detegovali 0,87% variabilitu. Podle kvalitativní interpretace hodnot F_{ST} (Wright 1943), hodnotící míry vzájemné genetické diferenciace (Pairwise Population Fst Values) mezi sledovanými soubory vzorků v naší studii byly zjištěny hodnoty od 0,003 do 0,038, tedy malá genetická diferenciace, ale hodnoty jsou vyšší v porovnání s hodnotou Fst (0,008) ze studie s rozdílnými ekotypy smrku ztepilého na území ČR (Bínová at al. 2020) a s hodnotami Fst (-0,0018–0,026) zjištěnými mezi 9 populacemi smrku ztepilého ve Švédsku (Androsuik et al. 2013). Analýzou Structure rozlišili Stojnić et al. (2019) 5 populací smrku ztepilého v Srbsku; tato analýza ukázala rozdíly i mezi námi sledovanými oddíly RM smrku ztepilého.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit možnosti využití objektivních metod DNA analýz pro ověřování deklarovaného původu RM smrku ztepilého v průběhu sledování identity semenného materiálu od sběru osiva až po dopěstování sazenic. V průběhu 3 let byly získány referenční vzorky, u kterých byly provedeny analýzy mikrosatelitových markerů a získané genetické kompozice sledovaných oddílů sadebního materiálu osmi uznaných jednotek byly po statistickém zpracování porovnány. Pro potřeby nastavení metodického postupu kontroly deklarovaného původu RM bylo vybráno 7 optimálně polymorfních markerů s dostatečnou vypovídací hodnotou pro následné zhodnocení genetické struktury sledovaných oddílů sadebního materiálu smrku ztepilého. U vybraných markerů byly optimalizovány postupy PCR a fragmentačních analýz. Pomocí provedené analýzy Structure byly získané profily 8 sledovaných oddílů (UJ) rozdílného původu mezi sebou odlišitelné.

Získané postupy lze následně využít v kontrolních systémech státní správy a pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a producentů sazenic. Nastavení objektivního způsobu kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu lesních dřevin je součástí plnění povinností ČR jako členské země EU.

Poděkování:

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1810129.

LITERATURA

Androsiuk P., Shimono A., Westin J., Lindgren D., Fries A., Wang X.-R. 2013. Genetic status of Norway spruce (*Picea abies*) breeding populations for Northern Sweden. Silvae Genetica, 62: 127–136. DOI: 10.1515/sg-2013-0017

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.

Bínová Z., Korecký J., Dvořák J., Bílý J., Zádrapová D., Jansa V., Lstibůrek M. 2020. Genetic structure of Norway spruce ecotypes studied by SSR markers. Forests, 11: 110. DOI: 10.3390/f11010110

Caré O., Gailing O., Müller M., Krutovsky K.V., Leinemann L. 2020. Mating system in a native Norway spruce (*Picea abies* [L.] KARST.) stand-relatedness and effective pollen population size show an association with the germination percentage of single tree progenies. Diversity, 12: 266. DOI: 10.3390/d12070266

Cvjetković B., Konnert M., Fussi B., Mataruga M., Šijačić-Nikolić M., Daničić V., Lučić A. 2017. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina. Genetika, 49: 259–272.

Earl D.A., Holdt B.M. von 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, 4: 359–361.

Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164 (4): 1567–1587. DOI: 10.1093/genetics/164.4.1567.

Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology, 7(4): 574–578. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x

Fluch S., Burg A., Kopecky D., Homolka A., Spiess N., Vendramin G.G. 2011. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). BMC Research Notes, 4: 401. DOI: 10.1186/1756-0500-4-401

Galović V., Šijačić-Nikolić M., Šafhauzer R., Čortan D., Orlović S. 2015. Genetic differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees with different crown types from the mountain Golija. Genetika, 47: 849–861. DOI: 10.2298/GENSR1503849G

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. DOI: 10.1007/s001220100684

Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources, 9 (5): 1322–1332. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x

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. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x

Klisz M., Ukalska J., Koprowski M., Tereba A., Puchałka R., Przybylski P., Jastrzębowski S., Nabais C. 2019. Effect of provenance and climate on intra-annual density fluctuations of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. in Poland. Agricultural and Forest Meteorology, 269–270: 145–156. DOI: 10.1016/j.agrformet.2019.02.013

Konnert M., Behm A. 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. Prague-Průhonice, Sept. 13-15, 2011: book of abstracts. Jíloviště, Forestry and Game Management Research Institute: 58.

Kotrla P., Pařízek M. 2008. Kontroly dodavatelů RM prováděné ze strany ÚHÚL. Lesnická práce, 87: 618–619.

Litt M., Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revelead by in vitro amplification of a dinucleotie repeat within the cardiac-muscle actin gene. American Journal of Human Genetics, 44: 397–401.

Maghuly F., Pinsker W., Praznik W., Fluch S. 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. Forest Ecology and Management, 222: 266–271. DOI: 10.1016/j.foreco.2005.10.025

Malá J., Cvrčková H., Máchová P., Konnert M. 2013. Možnosti kontroly identity reprodukčního materiálu lesních dřevin využívaného při umělé obnově lesa a zalesňování pomocí analýz DNA: odborné sdělení. Zprávy lesnického výzkumu, 58 (4): 388–390.

Melnikova M.N., Petrov N.B., Lomov A.A., la Porta N., Politov D.V. 2012. Testing of microsatellite primers with different populations of Eurasian spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb. Russian Journal of Genetics, 48: 562–566.

Meloni M., Perini D., Binelli G. 2007. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in the western Alps. Journal of Biogeography, 34: 929–938. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2006.01668.x

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283–292. DOI: 10.1086/282771

Nowakowska J.A., Zachara T., Konecka A. 2014. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. Leśne Prace Badawcze, 75 (1): 47–54.

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. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

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. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460

Pfeiffer A., Oliviery A.M., Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). Genome, 40: 411–419. DOI: 10.1139/g97-055

Piotti A., Garbarino M., Avanzi C., Berretti R., Motta R., Piovani P., Leonardi S. 2018. Influence of spatiotemporal dynamics on the fine-scale spatial genetic structure of differently managed *Picea abies* stands. Forests, 9: 622. DOI: 10.3390/f9100622

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155 (2): 945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945

Procházková Z. 2008. Povinnosti dodavatelů semenného materiálu. Lesnická práce, 87: 614–615.

Robichaud R.L, Glaubitz J.C., Rhodes O.E. Jr., Woestw 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

Rungis D., Bérubé Y., Zhang J., Ralph S., Ritland C.E., Ellis B.E., Douglas C., Bohlmann J., Ritland K. 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1283–1294. DOI: 10.1007/s00122-004-1742-5

Scotti I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. Genome, 43: 41–46.

Scotti I., Magni F., Paglia G.P., Morgante M. 2002. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. Theoretical and Applied Genetics, 106: 40–50. DOI: :10.1007/s00122-002-0986-1

Scotti I., Paglia G., Magni F., Morgante M. 2006. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. Annals of Forest Science, 63: 485–491. DOI: 10.1051/forest:2006029

Scotti I., Gugerli F., Pastorelli R., Sebastiani F., Vendramin G.G. 2008. Maternally and paternally inherited molecular markers elucidate population patterns and inferred dispersal processes on a small scale within a subalpine stand of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). Forest Ecology and Management, 255: 3806–3812. DOI: 10.1016/j.foreco.2008.03.023

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.

Shimono A., Wang X-R., Torimaru T., Lindgren D., Karlsson B. 2010. Spatial variation in local pollen flow and mating success in a *Picea abies* clone archive and their implications for a novel "breeding without breeding" strategy. Tree Genetics & Genomes, 7: 499–509. DOI: 10.1007/s11295-010-0351-5

Stojnić S.V., Avramidou E., Fussi B., Westergren M., Orlović S., Matović B., Trudić B., Kraigher H., Aravanopoulos F.A., Konnert M. 2019. Assessment of genetic diversity and population genetic structure of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) at its southern lineage in Europe. Implications for conservation of forest genetic resources. Forests, 10: 258. DOI: 10.3390/f10030258

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

Tollefsrud M.M., Sønstebø J.H., Brochmann C., Johnsen Ø., Skroppa T., Vendramin G.G. 2009. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. Heredity, 102: 549–562. DOI: 10.1038/hdy.2009.16

Unger G.M., Konrad H., Geburek T. 2011. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. Plant Systematics and Evolution, 292: 133–141. DOI: 10.1007/s00606-010-0407-x

Verbylaitė R., Pliūra A., Lygis V., Suchockas V., Jankauskienė J., Labokas J. 2017. Genetic diversity and its spatial distribution in self-regenerating Norway spruce and Scots pine stands. Forests, 8 (12): 470. DOI: 10.3390/f8120470

Wojnicka-Półtorak A., Prus-Głowacki W., Celiński K., Korczyk A. 2013. Genetic aspects of age dynamics of a natural *Picea abies* (L.) Karst. population in the Białowieża Primeval Forest, Poland. New Forests, 44: 811–825. DOI: 10.1007/s11056-013-9367-7

Wright S. 1943. Isolation by distance. Genetics, 28: 114–138.

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, 19: 395–420. DOI: 10.2307/2406450

USE OF DNA ANALYZES FOR VERIFYING THE DECLARED ORIGIN OF NORWAY SPRUCE REPRODUCTIVE MATERIAL

SUMMARY

Identity of forest tree reproductive material is essential in artificial forest regeneration. A certain proof of origin is important for tracing back forest reproductive material. The Czech Republic as a member state of the European Union has the obligation to create a functioning control system for determination of forest reproductive material. This commitment is also based on international legislation (Council Directive 1999/105/EC on the marketing of forest reproductive material on the market). Its aim is to ensure clear identification of reproductive material from the acquisition to delivery to the consumer. The Directive 1999/105/EC is transposed into national legislation by Act No. 149/2003 Coll., on the marketing of forest reproductive material of forestry importance and artificial hybrids, intended for forest regeneration and afforestation, and amending certain related acts (Act on Trade in reproductive material of forest trees), as amended, the provisions of which include appropriate adjustment control measures. The existing legal regulations on forest reproductive material in the Czech Republic provide only the inspection of the master certificates and delivery papers as a control measure. The aim of the work was to verify the level of genetic diversity, heterozygosity and other genetic characteristics of selected samples of Norway spruce reproductive material based on analyses of microsatellite (SSR) markers, to determine genetic similarity of monitored sources of forest reproductive material (units of forest reproductive material), and to verify suitability of methodology for monitoring identity of Norway spruce reproductive material. DNA analyses were performed on 1920 samples of plant material from 8 selected sources of reproductive material. Sampling of reference samples was performed from the sets and units of reproductive material listed in Table 1. Seed collections for units of reproductive material was done from 35–60 trees from 8 recognized stands. Sampling of material to analyses was carried out over 3 years. From each of 8 reproductive material units there were analysed 60 samples from raw cones seeds, 60 samples from seeds after extraction and cleaning, 60 samples from seedling production and 60 samples from transplanted plant. The genomic DNA was extracted by the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer´s instruction. Seven polymorphic markers (PAAC23, SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03) with the corresponding predictive value were selected from the original set of 26 tested microsatellite markers. PCR and fragment analysis procedures were optimized for selected markers. PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser. The statistical programs CERVUS (Kalinowski et al. 2007), GenAlEx 6.503 (Peakall, Smouse 2006, 2012), the Bayesian clustering method implemented in the software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003, 2007; Hubisz et al. 2009) were used to analyse the genetic data. PCR products of the selected markers generated simple patterns and provided variable expected sizes of alleles. The genetic diversity parameters with the primer sequences of the studied markers are reported in Table 2. The most polymorphic locus was WS0023.B03 and the least was WS0073.H08. Genetic diversity characteristics of the 32 Norway spruce sample sets are given in Table 3. Nei's genetic distances among 32 Norway spruce sample sets ranged from 0.04 to 0.325, and they are presented in Fig. 1, constructed on the basis of principal coordinate analysis (PCoA). The results of the AMOVA showed that variation among individuals was 10% and among the observed sample sets it was 3%. Pairwise population F_{ST} values ranging from 0.003 to 0.038 indicated low genetic differentiation between observed sets of sample. The structuring of investigated Norway spruce sample sets was also confirmed by various proportions of genetic profiles according to the Bayesian clustering method results (Fig. 2). Using the performed Structure analysis, the obtained profiles of 8 monitored units of reproductive material (4 sample sets from one units) of different origin were distinguishable from each other.

These methodological procedures could be used in state control systems of forest reproductive material origin, and in order to increase consumer protection of forest owners and nursery production in the Czech Republic.

Zasláno/Received: 23. 09. 2021

Přijato do tisku/Accepted: 15. 10. 2021