

VYUŽITÍ DNA MARKERŮ PRO KONTROLU DEKLAROVANÉHO PŮVODU REPRODUKČNÍHO MATERIÁLU BOROVICE LESNÍ (*PINUS SYLVESTRIS* L.)

USE OF DNA ANALYZES FOR VERIFYING THE DECLARED ORIGIN OF SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.) REPRODUCTIVE MATERIAL

PAVLÍNA MÁCHOVÁ - HELENA CVRČKOVÁ - OLGA TRČKOVÁ - KATEŘINA VÍTOVÁ

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 Scots pine in terms of the Czech Republic. Monitoring of reproductive material identity was carried out during four years, i.e., from seed collection to transplanted plants production. Reference samples from the 40 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 2390 samples of plant material from 10 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 Scots pine reproductive material by Bayesian clustering. Using the performed Structure analysis, the obtained profiles of 10 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 Summary at the end of the article.](#)

Klíčová slova: borovice lesní; původ reprodukčního materiálu; genetická diverzita; mikrosatelity

Key words: *Scots pine*; origin of forest reproductive material; genetic diversity; microsatellites

ÚVOD

Jednou z hlavních podmínek úspěšné umělé obnovy lesa s cílem udržet vysokou a kvalitní hospodářskou produkci a zajistit ochranu přirozeného genofondu domácích populací lesních dřevin je použití sadebního materiálu vhodného původu. Pro zajištění této podmínky je potřeba evidovat horizontální i vertikální přenos reprodukčního materiálu (RM) lesních dřevin. Každá členská země ES je povinna na základě směrnice Rady 1999/105/ES 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). V České republice byla zmíněná směrnice transponována do zákona č. 149/2003 Sb. (ve znění pozdějších předpisů). 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 sou-

časný 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. 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 (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 ČR je stávající systém kontroly odkázán na přísný dohled zaměřený na evidenci a kontrolu pohybu RM (KOTRLA, PAŘÍZEK 2008; PROCHÁZKOVÁ 2008). V procesu nakládání s RM lesních dřevin v ČR byly v průběhu prováděných kontrol a dozoru pověřenou osobou ÚHÚL zjištěny různé typy nedostatků, např. nestandardně vystavená potvrzení o původu, existence reprodukčního materiálu bez původu, množství vypěstovaných sazenic, neodpovídající množství reprodukčního materiálu na potvrzení o původu apod. (KOTRLA, PAŘÍZEK 2008). Nedostatkem v současnosti používaného kontrolního systému 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. Pro získání informací o genetické proměnlivosti studovaných jedinců je nutné vyhledat vysoce polymorfni DNA markery, např. mikrosatelitové (SSR) markery. V současnosti metoda SSR markerů patří mezi standardně využívané 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; VERBYLAITĚ et al. 2017). V této studii byly na základě analýz SSR markerů ověřeny úrovně genetické rozmanitosti, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristik u vybraných vzorků RM borovice lesní, zjištěny genetické struktury a podobnost sledovaných oddílů RM a ověřena vhodnost metodiky pro sledování identity RM u borovice lesní.

MATERIÁL A METODIKA

V provedené studii byly ověřeny možnosti využití DNA analýz pro sledování identity RM borovice lesní v různých fázích zpracování od sběru semenného materiálu až po dopěstování sadebního materiálu u 2390 rostlinných vzorků z 10 zdrojů reprodukčního materiálu (uznaných jednotek, UJ). Odběry referenčních vzorků z oddílů (UJ) byly realizovány v průběhu 4 let. V průběhu zpracování semenné suroviny bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků semen z osiva a 60 vzorků z osiva po zpracování, při následné produkci sadebního materiálu v poloprovozních podmínkách bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků z produkce semenáčků a 60 vzorků ze školkových sazenic. Přehled oddílů RM a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků je uveden v tab. 1.

Izolace DNA z rostlinného materiálu (klíčnicí rostlinky, 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 (Maestrogen). Genetické parametry zkoumaných souborů vzorků byly získány na základě fragmentačních analýz mikrosatelitových lokusů. U vzorků borovice lesní byly provedeny optimalizace podmínek polymerázových řetězových reakcí (PCR) pro získání amplifikátů u 14 mikrosatelitových markerů: psyl2, psyl16, psyl17, psyl36, psyl42, psyl57 (SEBASTIANI et al. 2012), SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5 (SORANZO et al. 1998), PtTX 3032, PtTX 3107, PtTX 3116, PtTX 4001, PtTX 4011 (BELLETTI et al. 2012). Optimalizované postupy PCR amplifikace poskytovaly reprodukovatelné jednoznačné údaje o velikosti alel studovaných lokusů. Pro potřeby nastavení metodického postupu kontroly deklarovaného původu RM bylo na základě vyhodnocení získaných genetických dat u testovaných lokusů vy-

bráno 7 optimálně polymorfních markerů s dostatečnou vypovídací hodnotou (psyl17, psyl42, psyl57, SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5, PtTX 3107). Amplifikace s ohledem na velikost alel a charakter reakčních podmínek PCR probíhaly ve 2 multiplexech, s výjimkou markeru PtTX 3107, u kterého byly reakční podmínky k PCR specifické. 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 PCR amplifikace 2 lokusů (psyl17, SPAC 11.4) a 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 MgCl₂, 0,2 mM směsi dNTP, 0,37 jednotek Platinum Taq DNA Polymerase, koncentrace specifických forward i reverse primerů byla 0,4 µM k lokusu psyl17 a 0,6 µM k lokusu SPAC 11.4. Reakční směs byla doplněna sterilní ultračistou vodou (Sigma – Aldrich) do objemu 15 µl. Teplotní profil PCR byl 3 minuty 94 °C pro počáteční denaturaci, následovalo 35 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. Složení PCR reakčních komponent pro amplifikaci druhého multiplexu, ve kterém byly zařazeny lokusy psyl42, psyl57, SPAC 12.5 a SPAG 7.14, bylo odlišné od reakční směsi prvního multiplexu pouze v koncentraci 0,067 mM směsi dNTPs a koncentrace specifických forward i reverse primerů byla 0,05 µM k lokusu psyl42, 0,2 µM k lokusům psyl57, SPAG 7.14 a 0,1 µM k lokusu SPAC 12.5. Teplotní profil PCR pro multiplex 2 byl stejný jako u multiplexu 1, pouze annealingová teplota byla 57 °C. Pro marker PtTX 3107 bylo složení PCR reakčních komponent stejné jako pro amplifikaci druhého multiplexu a koncentrace specifických forward i reverse primerů byla 0,05 µM. Teplotní profil PCR byl 95 °C, trvajících 3 minuty pro počáteční denaturaci, následovalo 30 cyklů se střídáním teplot 95 °C 45 sec., 57 °C (annealingová teplota) 59 sec., 72 °C 45 sekund. Finální elongační fáze probíhala při teplotě 72 °C po dobu 20 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 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007) a Genepop 4.7.5 (RAYMOND, ROUSSET 1995; ROUSSET 2008). Parametry genetické diverzity byly: počet rozdílných alel (Na), Shannonův informační index (I), hodnoty pozorované (H_p) a očekávané heterozygotnosti (H_e), fixační index (F), který byl kalkulován jako $F = 1 - (H_o/H_e)$ podle WRIGHTA (1965), Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972), analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis, PCoA), míry vzájemné genetické diferenciacie pomocí koeficientu inbreedingu (F_{ST}) a odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pro možnost porovnání populační struktury sledovaných souborů vzorků s využitím multilokusových genetických dat byla použita Bayesianá 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 smíšený 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 diferenciacie mezi porosty) byl nastaven model Lock prior. Optimální hodnota K (počet klastrů) byla zjištěna pomocí programu STRUCTURE SELECTOR (LI, LIU 2018).

Tab. 1.

Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků borovice lesní

Overview of forest reproductive material sources and designation of Scots pine sample sets

Označení oddílu/ Designation of forest re- productive material source	ČÚJ/ Source of forest reproductive material	Původ/Proof			Fáze odběru vzorku/ Sampling phase	Označení souboru vzorků/ Designation of sample set
		Rok zrání/ Maturation year	Lesní vegetační stupeň/ Forest vegetation zone	Přírodní lesní oblast/ Natural Forest Areas		
1	CZ-2-2B-BO-03324-39-3-T	2014	3. LVS	39 – Podbeskydská pahorkatina	osivo/seed	BO_1A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_1B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_1C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_1D
2	CZ-2-2B-BO-04715-10-3-S	2014	3. LVS	10 – Středočeská pahorkatina	osivo/seed	BO_2A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_2B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_2C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_2D
3	CZ-3-3-BO-00157-16-6-E	2015	6. LVS	16 – Českomoravská vrchovina	osivo/seed	BO_3A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_3B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_3C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_3D
4	CZ-3-3-BO-00082-15-3-C	2015	3. LVS	15 – Jihočeské pánve	osivo/seed	BO_4A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_4B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_4C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_4D
5	CZ-3-3-BO-00154-29-4-T	2018	4. LVS	29 – Nízký Jeseník	osivo/seed	BO_5A
					osivo po zpracování /seed after processing	BO_5B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_5C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_5D
6	CZ-2-2B-BO-03140-21-5-L	2014	5. LVS	21 – Jizerské hory a Ještěd	osivo/ seed	BO_6A
					osivo po zpracování /seed after processing	BO_6B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_6C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_6D
7	CZ-3-3-BO-00078-17-2-H	2014	2. LVS	17 – Polabí	osivo/seed	BO_7A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_7B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_7C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_7D
8	CZ-3-3-BO-00106-1-5-K	2017	5. LVS	1 – Krušné hory	osivo/seed	BO_8A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_8B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_8C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_8D
9	CZ-2-2B-BO-00021-15-3-C-G025-1	2017	3. LVS	15 – Jihočeské pánve	osivo/seed	BO_9A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_9B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_9C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_9D
10	CZ-3-3-BO-00079-6-2-P	2017	2. LVS	6 – Západočeská pahorkatina	osivo/seed	BO_10A
					osivo po zpracování/seed after processing	BO_10B
					semenáčky ve školce/nursery seedlings	BO_10C
					školované sazenice ve školce/nursery transplanted plants	BO_10D

VÝSLEDKY

U sledovaných 40 souborů vzorků borovice lesní původem z 10 oddílů (UJ) byly na základě analýz 7 mikrosatelitových lokusů získány genetické parametry. Vzorky z 10 sledovaných oddílů byly odebírány v průběhu zpracování semenné suroviny a při následné produkci sadebního materiálu v poloprovozních podmínkách. Byly hodnoceny hladiny genetické diverzity, heterozygotnosti a genetické vzdálenosti hodnocených souborů vzorků a genetická strukturalizace pro možnost porovnání souborů příslušných oddílů (UJ; tab. 1). Vybrané mikrosatelitové markery poskytovaly po optimalizaci amplifikačních podmínek jednoznačné a reprodukovatelné velikosti lokusů u hodnocených jedinců. Rozmezí velikostí alel u sledovaných lokusů a jejich další genetické charakteristiky jsou uvedeny v tab. 2. Počty alel u studovaných lokusů, získaných analýzami 2390 vzorků, se pohybovaly od 5 do 40, což potvrzuje dostatečnou až vyšší hladinu polymorfismu jak vybraných markerů, tak sledovaných souborů. Nejvíce polymorfni byl lokus SPAG 7.14, nejméně psyl42. Hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e), představující podíl očekávaných heterozygotů za předpokladu Hardy-Weinbergovy rovnováhy, se pohybovaly od 0,547 do 0,879 a nejvyšší hodnoty dosáhly lokusy SPAG 7.14, SPAC 12.5, SPAC 11.4. Pozorovaná četnost heterozygotů (H_o) u sledovaných markerů se pohybovala v intervalu od 0,547 u lokusu psyl17 do 0,879 u lokusu SPAC 12.5. Další zhodnocení genetické diverzity vyjádřené pomocí Shannonova informačního indexu (I) v sobě odráží i rovnoměrnou distribuci alelových frekvencí. Hodnoty se pohybovaly od 1,147 v lokusu psyl57 do 2,956 v lokusu SPAG 7.14. Pomocí statistického programu CERVUS byl pro použité lokusy stanoven polymorfni informační obsah (tab. 2). U sledovaných 2390 jedinců byla průměrná hodnota polymorfniho informačního obsahu (Polymorphism Information Content, PIC) 0,7697. Vzhledem ke skutečnosti, že markery jsou klasifikovány jako informativní, pokud hodnota PIC je $\geq 0,5$ (SHARMA et al. 2010), všechny použité markery byly informativní.

Odchytky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, založené na výpočtech chí-kvadrát testu se ukázaly v lokusu SPAG 7.14 ve všech 40 sledovaných souborech s výjimkou souboru BO_9C. V lokusu psyl42 byly nalezeny odchytky na hladině významnosti $P < 0,05$ v souborech BO_1B, BO_5C a BO_7C, s malou frekvencí byly nalezeny odchytky i u lokusu psyl57, a to v souborech BO_1A, BO_5D a BO_6C.

Genetické charakteristiky 40 sledovaných souborů vzorků jsou uvedeny v tab. 3. Ohodnocení genetické diverzity průměrným počtem různých alel ze všech analyzovaných mikrosatelitových lokusů bylo mezi soubory vyrovnané (11,429 – 14,000). Průměrný počet efektivních alel se pohyboval od 6,409 (BO_4A) do 8,615 (BO_2D). Genetická diverzita dle Shannonova indexu se ve sledovaných souborech vzorků pohybovala ve vyšších hodnotách, a to od 1,817 (BO_9B) do 2,038 (BO_2D). Privátní alely byly zjištěny u 8 vzorků, a to v souborech BO_1D, BO_2D, BO_4D, BO_6A, BO_8A, BO_8C (vždy 1 alela) a v souboru BO_2A byly nalezeny 2 privátní alely. U sledovaných souborů vzorků byla zjištěna 100% polymorfnost zkoumaných lokusů. Pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) byla procentuálně určena diferenciací mezi sledovanými soubory a mezi jedinci sledovaných souborů v programu GenALEX 6.503. Diferenciací mezi jednotlivými soubory byla 2 %, mezi sledovanými vzorky (jedinci) 16 %. Podle kvalitativní interpretace hodnot F_{ST} (WRIGHT 1943), hodnotící vzájemné genetické diferenciací (Pairwise Population Fst Values) mezi sledovanými soubory vzorků, byly při zjištěných hodnotách od 0,003 do 0,023 dosaženy malé genetické diferenciací. 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 soubory vzorků 10 sledovaných oddílů (UJ) se pohybovaly v rozmezí 0,027–0,162. Genetické vzdálenosti v rámci souborů vzorků (A-D) jednotlivých oddílů (UJ) měly hodnoty 0,022–0,068. Rozdíly genetických profilů mezi 40 sledovanými

Tab. 2.

Charakteristiky mikrosatelitových lokusů získaných ze 40 zkoumaných souborů vzorků borovice lesní
Characteristics of selected nuclear microsatellite loci across 40 investigated Scots pine 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
psyl17	F: TGG TCT GCA AAT CAA TCG AA R: GGG TAG GAA TGC AAG TTA GGC	219-245	8	6,125	1,486	0,547	0,735	0,259	0,73
psyl42	F: CAA CTT CAG CCT TGC AAC AA R: CGA CTT CAT TTG GAA CAC CA	165-175	5	4,500	1,237	0,677	0,668	-0,013	0,677
psyl57	F: CCC CAC ATC TCT ACA GTC CAA R: TGC TCT TGG ATT TGT TGC TG	183-207	9	6,000	1,147	0,565	0,563	-0,002	0,565
SPAG7.14	F: TTC GTA GGA CTA AAA ATG TGT G R: CAA AGT GGA TTT TGA CCG	174-252	40	25,075	2,956	0,631	0,936	0,327	0,900
SPAC11.4	F: CTT CAC AGG ACT GAT GTT CA R: TTA CAG CGG TTG GTA AAT G	125-171	23	13,375	2,065	0,760	0,822	0,078	0,821
SPAC12.5	F: CTT CTT CAC TAG TTT CCT TTG G R: TTG GTT ATA GGC ATA GAT TGC	120-198	38	24,450	2,901	0,879	0,933	0,057	0,944
PtTX3107	F: AAA CAA GCC CAC ATC GTC AAT C R: TCC CCT GGA TCT GAG GA	141-198	16	8,250	1,749	0,567	0,795	0,287	0,787

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; PIC: polymorfni informační obsah/polymorphism information content

Tab. 3.

Průměrné hodnoty genetických charakteristik pro 40 sledovaných souborů vzorků borovice lesní

Mean values for genetic characteristics of 40 investigated Scots pine sample sets

Soubory vzorků/ Sample sets	Na	Ne	I	Ho	He	F
BO_1A	12,143	6,952	1,928	0,648	0,778	0,161
BO_1B	12,143	7,151	1,879	0,600	0,757	0,197
BO_1C	12,429	6,895	1,914	0,643	0,776	0,160
BO_1D	12,286	6,448	1,869	0,637	0,761	0,150
BO_2A	13,143	7,603	1,955	0,633	0,779	0,182
BO_2B	14,000	7,635	1,956	0,631	0,774	0,174
BO_2C	12,714	7,808	2,003	0,689	0,801	0,130
BO_2D	13,571	8,615	2,038	0,626	0,801	0,215
BO_3A	12,429	6,950	1,906	0,612	0,767	0,198
BO_3B	12,143	7,250	1,941	0,674	0,787	0,137
BO_3C	12,429	7,372	1,938	0,707	0,787	0,093
BO_3D	11,714	6,967	1,917	0,680	0,791	0,138
BO_4A	12,429	6,409	1,824	0,655	0,747	0,107
BO_4B	12,857	7,276	1,966	0,650	0,777	0,156
BO_4C	13,429	7,561	1,989	0,685	0,787	0,127
BO_4D	12,571	7,610	1,916	0,640	0,774	0,165
BO_5A	12,429	7,523	1,998	0,685	0,803	0,135
BO_5B	13,286	7,640	1,979	0,678	0,786	0,129
BO_5C	12,714	7,868	1,937	0,682	0,778	0,111
BO_5D	13,286	7,432	1,962	0,656	0,782	0,155
BO_6A	13,000	7,444	1,923	0,662	0,769	0,116
BO_6B	11,429	6,861	1,821	0,648	0,751	0,130
BO_6C	11,571	7,676	1,906	0,734	0,780	0,044
BO_6D	11,571	6,917	1,863	0,613	0,765	0,181
BO_7A	13,857	7,914	2,012	0,693	0,793	0,121
BO_7B	12,429	7,295	1,925	0,652	0,775	0,143
BO_7C	12,571	7,701	1,956	0,762	0,791	0,019
BO_7D	12,714	7,725	1,973	0,636	0,797	0,185
BO_8A	12,571	6,545	1,891	0,644	0,760	0,149
BO_8B	12,857	7,620	1,965	0,657	0,786	0,166
BO_8C	12,714	6,839	1,942	0,670	0,769	0,120
BO_8D	12,429	7,193	1,946	0,639	0,779	0,168
BO_9A	12,286	7,393	1,944	0,634	0,786	0,183
BO_9B	11,571	6,542	1,817	0,611	0,745	0,160
BO_9C	11,714	7,129	1,859	0,745	0,755	0,005
BO_9D	12,571	8,001	2,011	0,679	0,804	0,141
BO_10A	12,571	7,355	1,950	0,640	0,793	0,190
BO_10B	12,429	7,284	1,942	0,652	0,777	0,146
BO_10C	11,857	7,291	1,945	0,697	0,795	0,111
BO_10D	12,714	7,137	1,973	0,647	0,800	0,184

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

soubory vzorků byly dále ověřovány analýzou Structure z alelických dat jednotlivých vzorků. Optimální počet klastřů byl stanoven pomocí Structure Selectoru na $K = 5$, tedy soubory vzorků byly strukturovány do 5 barevně odlišných profilů (obr. 2). Jednotlivé stromy všech souborů vzorků byly zastoupeny ve všech klastrech, které se ale lišily ve velikostních podílech (barevně znázorněných) dle genetických profilů. Struktura klastřů byla pro každý oddíl odlišná. U souborů vzorků (A – D) patří k oddílu 1 měl převahu fialový klastř (60–68,2 %), u souborů vzorků oddílu 2 měl převahu červený klastř (36,6–42,2 %) a dále měl vysoké zastoupení oranžový klastř (20,9–26 %), u souborů vzorků oddílu 3 byl nejvíce zastoupen zelený klastř (39,7–55,4 %). V souborech vzorků oddílu 4 převažoval modrý klastř (41,3–57 %), u souborů vzorků oddílu 5 byl nejvíce zastoupen červený klastř (31,8–56,7 %) a částečně modrý klastř (16,1–24,8 %), v souborech vzorků oddílu 6 byl nejvíce zastoupen oranžový klastř v podílech 53–79,3 %. V souborech vzorků oddílu 7 měl převahu červený klastř (37,3–47 %) a dále měl vysoké zastoupení oranžový klastř (20,4–35,2 %), v souborech vzorků oddílu 8 byl nejvíce zastoupen modrý klastř v podílech 33,7–53,2 % a částečně fialový klastř (21,2–37,2 %). U souboru vzorků oddílu 9 byl nejvíce zastoupen modrý klastř v podílech 38,2–54,4 % a částečně oranžový klastř (17,9–26,6 %), u souboru vzorků oddílu 10 bylo zjištěno vysoké zastoupení červeného klastřu v podílech 55,4–67 %. Získané profily 10 sledovaných oddílů (UJ) rozdílného původu byly mezi sebou odlišitelné.

DISKUSE

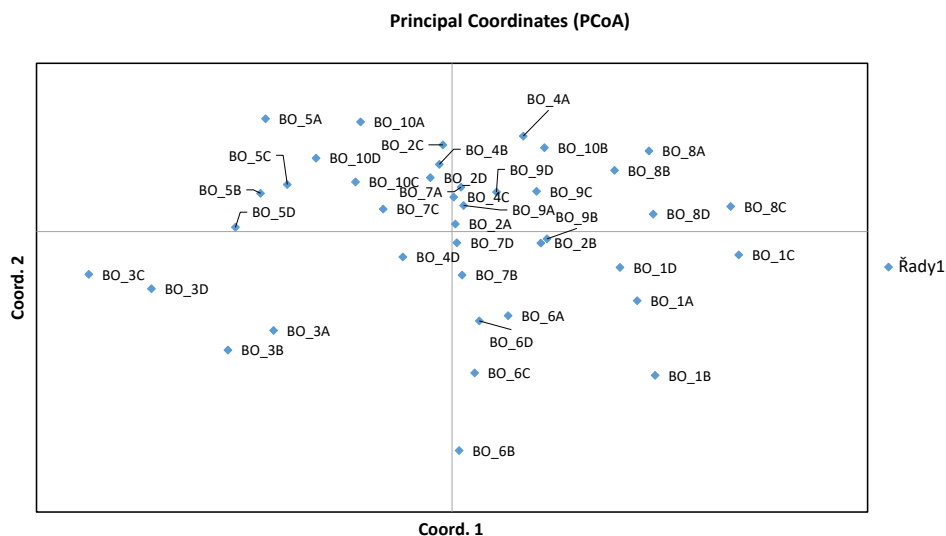
Analýza mikrosatelitových markerů se stala standardně využívanou technikou pro genetické analýzy. Má široké uplatnění v populační genetice, při tvorbě genetických map, využívá se i při analýzách toku genů (SONG et al. 2011). Jedná se o vhodnou a široce využívanou metodu pro identifikaci variet u většiny kulturních druhů rostlin (PAN 2010) i dřevin (ROBICHAUD et al. 2006). Mikrosatelitové markery pro studium genetické struktury a diversity porostů borovice lesní již uplatnila řada autorů (NOWAKOWSKA et al. 2014; MÁCHOVÁ et al. 2016; PAZOUKI et al. 2016; LESICZKA et al. 2017; DERING et al. 2021). Mikrosatelitové markery využili pro studium genetické diversity u marginálních stanovišť borovice lesní ve východních a jižních Karpatech SOFLETEA et al. (2020). Pomocí mikrosatelitových markerů provedli zhodnocení genetické diversity, původu a demografickou studii rozšíření borovice lesní v Karpatech a Pannonské pánvi TÓTH et al. (2017, 2019). Pomocí 6 mikrosatelitových markerů zjistili genetickou diversitu 12 bulharských proveniencí borovice lesní NAYDENOV et al. (2011). Genetickou variabilitu 16 polských proveniencí borovice lesní hodnotili s využitím 18 jaderných mikrosatelitových markerů HEBDA et al. (2017). Populačně genetickou studii založenou na analýzách 10 mikrosatelitových markerů provedli u 13 rumunských a 2 maďarských populací borovice lesní BERNHARDSSON et al. (2016), v Itálii byla zhodnocena genetická variabilita 21 populací pomocí 9 SSR markerů (BELLETTI et al. 2012) a v Srbsku pomocí 4 SSR markerů zhodnotili 7 populací borovice lesní LUČIČ et al. (2014). Variabilita 25 populací borovice lesní z areálu severní Evropy (Estonsko, Finsko, Litva, Norsko, Skotsko a Švédsko) byla zhodnocena 7 mikrosatelitovými lokusy ve studii ZIMMER et al. (2018). Pro sledování vlivu výchovy porostů na diversitu porostů borovice lesní v Litvě využili mikrosatelitové markery DANUSEVIČIUS et al. (2016) a 27 autochtonních litevských populací borovice lesní zhodnotili DANUSEVIČIUS et al. (2021).

V naší studii bylo na základě zhodnocení provedených analýz 2390 vzorků pomocí 14 testovaných mikrosatelitových markerů vybráno 7 markerů s odpovídající výpovědní hodnotou pro možnou kontrolu původu RM: psyl17, psyl42, psyl57, SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5, PtTX 3107. Markery psyl jsou specifické pro *P. sylvestris*,

autoři SEBASTIANI et al. (2012) je testovali na třech geograficky vzdálených populacích borovice lesní (Rusko, Finsko). Celkový počet detegovaných alel u lokusů psyl17, psyl42 a psyl57 byl srovnatelný s výsledky našich analýz s tím, že celkový počet alel u lokusů použitých v naší studii byl vyšší o 1–3 alely. Obdobný počet alel u lokusů psyl42 (6 alel) a psyl57 (7 alel) byl nalezen u populací borovice lesní v Polsku (HEBDA et al. 2017). Markery série SPA pro borovici lesní vyvinuli SORANZO et al. (1998), v pilotní studii provedené na 14 vzorcích DNA bylo u těchto lokusů detegováno 6–10 alel, u našich vzorků bylo zjištěno 23–40 alel. BELLETTI et al. (2012) ve své studii genetické variability a divergence borovice lesní na území Itálie sledovali 449 jedinců z 21 populací pomocí 9 vybraných SSR markerů, počty detegovaných alel u lokusů SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12. byly v rozmezí 38–64, pro lokus PtTX 3007 našli 22 alel. Lokus SPAG 7.14 použili NOWAKOWSKA et al. (2014) pro studii genetické variability mateřského porostu a přirozené obnovy borovice lesní v polské oblasti Oława, v daném lokusu detegovali 21 alel. Ve studii sledující pět populací borovice lesní v České republice bylo nalezeno 9 alel u lokusu PtTX 3107, 29 alel u lokusu SPAG 7.14, 32 alel u lokusu SPAC 12.5 (MÁCHOVÁ et al. 2016). LUČIČ et al. (2014) detegovali u sedmi srbských populací u lokusu SPAC 12.5 pouze pět alel, u stejného lokusu našli PAZOUKI et al. (2016) 43 alel při genetickém screeningu 180 stromů ze tří estonských populací; tento lokus byl vysoce polymorfní i u populací v Litvě, kde bylo nalezeno 36 alel (DANUSEVIČIUS et al. 2016). V naší studii bylo nalezeno v případě tohoto lokusu 38 alel. V námi analyzovaných 2390 vzorcích byl nejvíce polymorfní lokus SPAG 7.14 (40 alel), jako nejméně polymorfní byl ve všech studiích shodně vyhodnocen lokus psyl42.

V italských populacích BELLETTI et al. (2012) detegovali 137 privátních alel, v 8 populacích z 12 z provenienčního pokusu v Bulharsku byla zjištěna přítomnost privátních alel (NAYDENOV et al. 2011) a v 5 populacích z území ČR bylo detegováno 24 privátních alel (MÁCHOVÁ et al. 2016), v případě této studie bylo zjištěno pouze 8 privátních alel.

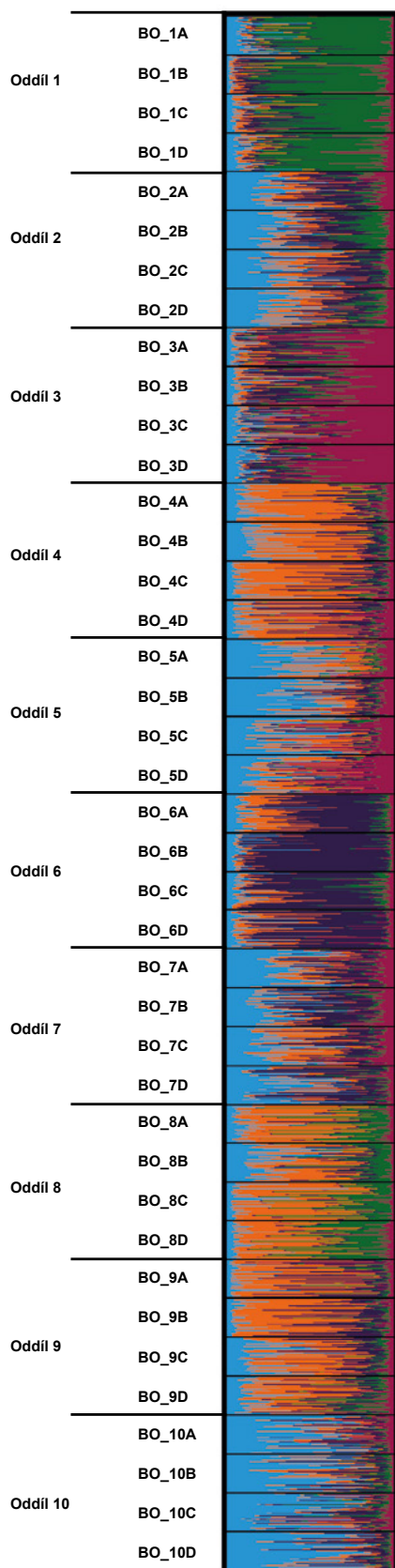
Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti H_e se u 21 italských populací (BELLETTI et al. 2012) pohybovaly v rozmezí 0,754–0,886, u 13 rumunských populací z Karpat v rozmezí 0,43–0,62 a u dvou maďarských populací 0,54 a 0,55 (BERNHARDSSON et al. 2016). U studie tří populací borovice lesní ve Švédsku zjistili GARCÍA-GIL et al. (2015) hodnoty H_e 0,79–0,8, v případě tří estonských populací byly tyto hodnoty zjištěny v rozmezí 0,77–0,80 (PAZOUKI et al. 2016). SCALFI et al. (2009) sledovali genetickou variabilitu italských marginálních populací borovice lesní v Apeninách, u nichž při použití lokusů ze série SPA zjistili hodnoty H_e 0,74–0,80; jako srovnání použili Alpskou populaci, kde byla zjištěná hodnota H_e 0,91. Vysoké hodnoty očekávané genetické diverzity (0,64–0,8) byly nalezeny i u 25 severoevropských populací borovice lesní (ZIMMER, SØNSTEBØ 2018). V případě 8 bulharských marginálních populací borovice lesní byla zjištěna průměrná hodnota genetické diverzity $H_e = 0,697$ (SOFLETEA et al. 2020). U 20 marginálních populací borovice lesní z území Maďarska, Slovenska, Rumunska, Estonska a Bulharska byly zjištěny hodnoty H_e v rozmezí 0,493–0,648 (TÓTH et al. 2017). Hodnoty H_e v rozmezí 0,646–0,692 byly detegovány u 5 českých populací, zahrnující i marginální populace (extrémní stanoviště hadcového podloží nebo vysoké nadm. výšky) (MÁCHOVÁ et al. 2016). V naší studii byly nalezeny vysoké hodnoty H_e (0,745–0,803), které jsou podobné hodnotám nalezeným u populací borovice lesní v evropském areálu jejího rozšíření. Pro sledování genetické diversity je využíván i koeficient inbreedingu (F_{ST}), jenž porovnává míru genetické diferenciace párově mezi populacemi. V naší studii se hodnoty F_{ST} mezi soubory vzorků 10 sledovaných oddílů (UJ) pohybovaly v rozmezí 0,004–0,023. BELLETTI et al. (2012) zjistili rozsah hodnot F_{ST} mezi italskými, převážně alpskými populacemi 0,015–0,141. Při srovnání alpských a apeninských italských populací zjistili hodnoty F_{ST} v rozsahu 0,06–0,1 SCALFI et al. (2009). NOWAKOWSKA et al. (2014) zjistili průměrnou hodnotu F_{ST} u polských populací 0,082, u 16 populací z provenienčních pokusů v Polsku byly hodnoty F_{ST} v rozmezí 0,003–0,058 (HEBDA et al. 2017). U rumunských populací byla celková hodnota F_{ST} 0,056 (BERNHARDSSON et al. 2016). PAZOUKI et al. (2016) zjistili celkovou



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

Obr. 2. Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro $K = 5$ u 40 sledovaných souborů vzorků borovice lesní

Fig. 2. Evaluation of genetic structure by Bayesian method for $K = 5$ in 40 observed Scots pine sample sets



hodnotu F_{ST} u tří estonských populací 0,007. Zjištěné F_{ST} párové hodnoty pro 5 populací borovice lesní v ČR se pohybovaly v rozmezí od 0,008 do 0,017 (MÁCHOVÁ et al. 2016). Míra genetické diferenciace mezi sledovanými oddíly v naší studii byla nízká; toto zjištění je v souladu s výsledky studií populací borovice lesní v Evropě. Nízká úroveň genetické diferenciace mezi populacemi, vyjádřená pomocí F_{ST} , se vyskytuje obecně u lesních dřevin a zvláště u jehličnanů (HAMRICK et al. 1992). HEBDA et al. (2017) pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) zjistili 3% varianci mezi sledovanými populacemi borovice lesní v Polsku, u námi sledovaných souborů vzorků byla zjištěna 2% variabilita mezi jednotlivými soubory. Analýzu Structure k rozlišení populací využilo ve svých studiích mnoho autorů, např. NAYDENOV et al. (2011), BELLETTI et al. (2012), HEBDA et al. (2017), TÓTH et al. (2017, 2019), ZIMMER et al. (2018), SOFLETEA et al. (2020) a DERING et al. (2021). Tato analýza ukázala rozdíly i mezi námi sledovanými oddíly RM borovice lesní.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit možnosti využití objektivních metod DNA analýz pro ověřování deklarovaného původu RM borovice lesní sledováním identity semenného materiálu v průběhu produkce sazenic.

V období 4 let byly získány referenční vzorky, u kterých byly provedeny analýzy mikrosatelitových markerů a získané genetické kompozice sledovaných oddílů sadebního materiálu deseti 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 borovice lesní. U vybraných markerů byly optimalizovány postupy PCR a fragmentačních analýz. Pomocí provedené analýzy Structure byly získané profily 10 sledovaných oddílů (UJ) různého 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 je součástí plnění povinností ČR jako členské země EU vytvářet kontrolní systémy se zachováním pravdivé identity v celém průběhu nakládání s lesním reprodukčním materiálem.

Poděkování:

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

LITERATURA

- BACILIERI R., DUCOUSO 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.
- BELLETTI P., FERRAZZINI D., PIOTTI A., MONTELEONE I., DUCCI F. 2012. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *European Journal of Forest Research*, 131: 1127–1138. DOI: 10.1007/s10342-011-0584-3

- BERNHARDSSON C., FLORAN V., GANEA S.L., GARCÍA-GIL M.R. 2016. Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution. *Forest Ecology and Management*, 361: 131–143. DOI: 10.1016/j.foreco.2015.10.047
- DANUSEVIČIUS D., KERPAUSKAITE V., KAVALIAUSKAS D., FUSSI B., KONNERT M., BALIUCKAS, V. 2016. The effect of tending and commercial thinning on the genetic diversity of Scots pine stands. *European Journal of Forest Research*, 135 (6): 1159–1174. DOI: 10.1007/s10342-016-1002-7
- DANUSEVIČIUS D., BUCHOVSKA J., ŽULKUS V., DAUGNORA L., GIRININKAS A. 2021. DNA markers reveal genetic associations among 11,000-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) found in the Baltic Sea with the present-day gene pools in Lithuania. *Forests*, 12: 317. DOI: 10.3390/f12030317
- DERING M., BARANOWSKA M., BERIDZE B., CHYBICKI I.J., DANIELLA I., ISZKUŁO G., KVARTSKHAVA G., KOSIŃSKI P., RACZKA G., THOMAS P.A., TOMASZEWSKI D., WALAS Ł., SĘKIEWICZ K. 2021. The evolutionary heritage and ecological uniqueness of Scots pine in the Caucasus ecoregion is at risk of climate changes. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 11(1): 22845. DOI: 10.1038/s41598-021-02098-1
- 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
- GARCÍA-GIL M.R., FLORAN V., ÖSTLUND L., MULLIN T.J., GULL B.A. 2015. Genetic diversity and inbreeding in natural and managed populations of Scots pine. *Tree Genetics & Genomes*, 11: 28. DOI: 10.1007/s11295-015-0850-5
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., SHERMAN-BROYLES S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6: 95–124.
- HEBDA A., WÓJKIEWICZ B., WACHOWIAK W. 2017. Genetic characteristics of Scots pine in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Silva Fennica*, 51(2): 1721. DOI: 10.14214/sf.1721
- 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
- 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.
- LESICZKA P., PAWLACZYK E.M., ŁABISZAK B., URBANIAK L. 2017. Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) called Tabórz pine (forest district Miłomłyn) expressed in analysis of morphology of needle traits and polymorphism of microsatellite DNA. *Lesne Prace Badawcze*, 78 (2): 136–148. DOI: 10.1515/frp-2017-0015
- LI Y-L., LIU J-X. 2018. StructureSelector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18: 176–177. DOI: 10.1111/1755-0998.12719
- LUČIČ A., POPOVIČ V., NEVENIČ M., RISTIČ D., RAKONJAC L., ČIRKOVIČ-MITROVIČ T., MLADENOVIČ-DRINIČ S. 2014. Genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Serbia revealed by SSR markers. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 66 (4): 1485–1492.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O. 2016. Genetická variabilita vybraných populací borovice lesní v České republice. *Zprávy lesnického výzkumu*, 61 (3): 223–229.
- 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.
- NAYDENOV K.D., NAYDENOV M.K., TREMBLAY F., ALEXANDROV A., AUBIN-FOURNIER L. 2011. Patterns of genetic diversity that result from bottlenecks in Scots pine and the implications for local genetic conservation and management practices in Bulgaria. *New Forests*, 42 (2): 179–193. DOI: 10.1007/s11056-010-9245-5
- 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. *Lesne 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. DOI: 10.4236/ajps.2010.12011
- PAZOUKI L., SHANJANI P.S., FIELD P.D., MARTINS K., SUHHORUTŠENKO M., VIINALASS H., NIINEMETS Ü. 2016. Large within-population genetic diversity of the widespread conifer *Pinus sylvestris* at its soil fertility limit characterized by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research*, 135: 161–177. DOI: 10.1007/s10342-015-0928-5
- 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
- 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.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- 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
- ROUSSET F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- SCALFI M., PIOTTI A., ROSSI M., PIOVANI P. 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. *European Journal of Forest Research*, 128: 377–386. DOI: 10.1007/s10342-009-0273-7
- 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
- SEBASTIANI F., PINZAUTI F., KUJALA S.T., GONZÁLES-MARTÍNEZ S.C., VENDRAMIN G.G. 2012. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*, 4: 231–234.
- 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.
- ȘOFLETEA N., MIHAI G., CIOCÎRLAN E., CURTU A.L. 2020. Genetic diversity and spatial genetic structure in isolated Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations native to eastern and southern Carpathians. *Forests*, 11(10): 1047. DOI: 10.3390/f11101047
- SONG S., DEY D.K., HOLSINGER K.E. 2011. Genetic diversity of microsatellite loci in hierarchically structured populations. *Theoretical Population Biology*, 80 (1): 29–37. DOI: 10.1016/j.tpb.2011.04.004
- SORANZO N., PROVAN J., POWELL W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7: 1260–1261.
- TÓTH E.G., VENDRAMIN G.G., BAGNOLI F., CSEKE K., HÖHN M. 2017. High genetic diversity and distinct origin of recently fragmented Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations along the Carpathians and the Pannonian basin. *Tree Genetics & Genomes*, 13 (2): 1–12. DOI: 10.1007/s11295-017-1137-9
- TÓTH E.G., BEDE-FAZEKAS Á., VENDRAMIN G.G., BAGNOLI F., HÖHN M. 2019. Mid-Pleistocene and Holocene demographic fluctuation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Carpathian Mountains and the Pannonian Basin: Signs of historical expansions and contractions. *Quaternary International*, 504: 202–213. DOI: 10.1016/j.quaint.2017.11.024
- 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
- 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
- ZIMMER K., SØNSTEBØ J.H. 2018. A preliminary study on the genetic structure of Northern European *Pinus sylvestris* L. by means of neutral nuclear microsatellite markers. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 33(1): 6–13. DOI: 10.1080/02827581.2017.1337919

USE OF DNA ANALYZES FOR VERIFYING THE DECLARED ORIGIN OF SCOTS PINE 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 Scots pine reproductive material based on analyses of microsatellite (SSR) markers, to determine genetic structures of monitored sources of forest reproductive material (units of forest reproductive material) and to verify suitability of methodology for monitoring identity of Scots pine reproductive material.

DNA analyses were performed on 2390 samples of plant material from 10 selected sources of reproductive material. Sampling of reference samples was performed from the sets and units of reproductive material listed in Table 1. Sampling of material to analyses was carried out over 4 years. From each of 10 reproductive material units there were analysed 60 samples from seeds, 60 samples from seeds after processing, 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 (psyl17, psyl42, psyl57, SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5, PtTX3107) with the corresponding predictive value were selected from the original set of 14 tested microsatellite markers. PCR and fragment analysis procedures were optimised 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), Genepop 4.7.5 (RAYMOND, ROUSSET 1995; ROUSSET 2008) and 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 SPAG 7.14 and the least was psyl42. Genetic diversity characteristics of the 40 Scots pine sample sets are given in Table 3. Nei's genetic distances among 40 Scots pine sample sets ranged from 0.027 to 0.162, 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 16% and among the observed sample sets it was 2%. Pairwise population F_{ST} values ranging from 0.004 to 0.023 indicated low genetic differentiation among observed sets of samples. The structuring of investigated Scots pine 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 10 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: 03. 08. 2022

Přijato do tisku/Accepted: 07. 09. 2022