

METODIKA VYUŽITÍ DNA MARKERŮ PRO SYSTÉM KONTROLY DEKLAROVANÉHO PŮVODU REPRODUKČNÍHO MATERIÁLU BUKU LESNÍHO



Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.
a kol.

Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu buku lesního

Certifikovaná metodika

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Bc. Kateřina Vítová

Ing. Josef Cafourek, Ph.D.

Ing. Ladislav Šimerda, Ph.D.

Lesnický průvodce 10/2022

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-245-8

ISSN 0862-7657

METHODOLOGY OF USING DNA MARKERS FOR THE SYSTEM OF CONTROL OF DECLARED ORIGIN OF REPRODUCTIVE MATERIAL OF EUROPEAN BEECH

Abstract

The aim of this methodology is to present the possibilities of using objective methods of DNA analysis to verify the declared origin of reproductive material of European beech in terms of the Czech Republic. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The methodological procedures are based on a study of monitoring the genetic identity of reproductive material, which was carried out during four years, i.e. from the seeds to transplanted plants production. Analyses of selected microsatellite markers were performed on 1244 samples of the 21 sets of reproductive material from 7 selected sources of forest reproductive material (units of forest reproductive material) and the genetic compositions of sets were compared after statistical processing. Nine optimally polymorphic markers with sufficient informative value were selected for the evaluation of the genetic structure of the monitored sets of European beech reproductive material. Using the performed Structure analysis by Bayesian clustering, the obtained profiles of 7 monitored units of reproductive material (3 sample sets from one units) of different origin were distinguishable from each other. These methodological procedures could be used in the state control systems of verifying declared origin of European beech forest reproductive material, and to increase consumer protection of forest owners and nursery producers in the Czech Republic.

Key words: European beech; control systems of forest reproductive material origin; SSR markers

Oponenti: Ing. Vlasta Knorová, DiS., Ministerstvo zemědělství ČR, odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů
Ing. Alžběta Pařízková, ÚHUL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové
RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant

Adresy autorů:

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Bc. Kateřina Vítová

Ing. Josef Cafourek, Ph.D.

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

e-mail: machova@vulhm.cz

cvrckova@vulhm.cz

trckova@vulhm.cz

vitova@vulhm.cz

josef.cafourek@seznam

Ing. Ladislav Šimerda, Ph.D.

Lesy Colloredo-Mansfeld s.r.o.

U půjčovny 968/5

110 00 Praha 1 – Nové Město

e-mail: simerda@colloredo.opocno.cz

Obsah:

I	CÍL METODIKY	7
II	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1	ÚVOD	7
2	METODICKÝ POSTUP	9
a	Odběr vzorků a postupy izolace DNA	9
b	Postupy PCR amplifikace	12
c	Postupy elektroforézy v agarózovém gelu	15
d	Postupy fragmentační analýzy	
a	hodnocení PCR produktů	16
e	Zpracování molekulárních dat	17
III	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	19
IV	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	21
V	EKONOMICKÉ ASPEKTY	22
VI	DEDIKACE	25
VII	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	26
VIII	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY	
	METODICE	30
	Summary	31
	Příloha	33

Zkratky použité v textu:

DNA deoxyribonukleová kyselina

nSSR nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

RM reprodukční materiál

ÚHÚL Ústav pro hospodářskou úpravu lesů

I CÍL METODIKY

Cílem práce bylo zpracovat metodické postupy analýz DNA s využitím vybraných mikrosatelitových markerů pro možnost ověření genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) buku lesního v průběhu procesu nakládání s reprodukčním materiálem, od sběru semenného materiálu až po do-pěstování sadebního materiálu. Získané postupy lze následně využít v kontrolních systémech státní správy a pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a pro-
ducentů sazenic.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

Umělá obnova lesa zůstává v rámci České republiky převládajícím způsobem zalesňování. 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 lesa je použití sadebního materiálu vhodného původu. Význam kvality zdrojů reprodukčního materiálu lesních dřevin je dán vysokou mírou dědičné podmíněnosti mnoha důležitých znaků a vlastností, tj. vysokou mírou jejich přenosu z rodičů na potomstvo. Míra dědičné podmíněnosti znaku je vyjádřena jeho dědivostí (heritabilitou). Například potvrzené vysoké hodnoty koeficientu dědivosti pro vidličnatost, točitost a trhliny kmene u listnatých dřevin znamenají, že v další generaci lesa se tyto nežádoucí znaky objeví u více než poloviny potomstva stromů, které jsou nositeli těchto znaků. Přenos nežádoucích znaků z rodičovských stromů (zdrojů reprodukčního materiálu) tedy významně snižuje kvalitu produkce zakládaných porostů, resp. další generace lesa. Kvalitní dědičný základ reprodukčního materiálu je jednorázovým vstupem do produkčního cyklu lesa a k následné realizaci produkce není zapotřebí vynakládat dodatečné prostředky. Pro produkci a ekologickou stabilitu lesa je proto ze středně- i dlouhodobého hlediska důležitější kvalitní zdroj reprodukčního materiálu a jeho vhodný původ (záruka pravosti zdroje a původu) než technická kvalita sazenic (GÖMÖRY, LONGAUER 2014). Zajištění vhodného původu RM je spojené s potřebou evidovat horizontální i vertikální přenosy reprodukčního materiálu lesních dřevin, s cílem udržet vysokou a kvalitní hospodářskou produkci a zajistit ochranu přirozené-

ho 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 zdroje. Velká část sadebního materiálu pěstovaného v lesních školkách pochází z osiva lesních porostů, což jsou populace s vysokou genetickou diverzitou (kdy navíc je genetická struktura konkrétního oddílu osiva vlivem rozdílných opylovacích poměrů 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 využívaných i u lesních dřevin otevřel v této složité problematice kontroly identity lesního RM nové možnosti.

Genetickou skladbu organismů a jejich variabilitu na úrovni populací a jedinců lze stanovit pomocí DNA markerů, které na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Např. často využívané jsou mikrosatelitové markery (SSR markery), které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a jsou vhodné pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu buku lesního například v semenných sadech (HASENKAMP et al. 2011; SJÖLUND, JUMP 2015; CVRČKOVÁ et al. 2016) a jsou široce využívány ke studiu genetické struktury a diversity bukových porostů (ODDOU–MURATORIO et al. 2011; PIOTTI et al. 2012; KEMPE, KONNERT 2016; CVRČKOVÁ et al. 2017; SJÖLUND et al. 2017; CUERVO-ALARCON et al. 2018; JANKOVIĆ et al. 2019; REDİ et al. 2019; ZÁDRAPOVÁ et al. 2020; HÖHN et al. 2021; KEMBRYTĚ et al. 2021; TSIPIDOU et al. 2021). 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, tyto byly později nahrazeny markery s vyšší rozlišovací schopností (SSR markery). Pro možnost kontroly identity oddílů RM jsou vhodné SSR markery vykazující spíše střední genetickou variabilitu, zároveň ale jsou dostatečně variabilní na úrovni sledovaných souborů (KONNERT, BEHM 2006).

Účelem zpracovávaných metodických postupů bylo pro možnost ověřování podobnosti genetické struktury vybraných oddílů RM buku lesního vybrat vhodné jaderné mikrosatelity, nuclear simple sequence repeats (nSSR markery) s dostačující genetickou variabilitou, ověřit vhodnou velikost souborů vzorků pro postup odběru referenčních vzorků při procesu provozního nakládání s RM a zpracovat vhod-

né postupy vyhodnocení genetických analýz. Získané metodické postupy kontroly identity RM buku lesního, založené na aplikaci molekulárních metod, lze následně využít v kontrolních systémech státní správy a pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a producentů sazenic.

2 Metodický postup

Nastavení metodického postupu sledování identity RM pomocí DNA analýz vycházelo z poloprovozní modelové studie, ve které byly analýzy vybraných SSR markerů provedeny u 1244 vzorků rostlinného materiálu ze 7 zdrojů reprodukčního materiálu (uznaných jednotek, UJ) buku lesního. V průběhu zpracování semenné suroviny bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků semen z osiva, při následné produkci sadebního materiálu v poloprovozních podmínkách bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků z produkce semenáčků a 60 vzorků ze školkovaných sazenic. Odběry referenčních vzorků z oddílů (UJ) byly realizovány v průběhu 4 let. Odběry vzorků byly provedeny metodou náhodného výběru tak, aby v sebraných souborech vzorků byly zahrnuty reprezentativně vzorky z celé sledované UJ. Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků je uveden v příloze (Tab. 2.).

a Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro sledování identity RM je velmi důležité získat u analyzovaných stromů eluáty DNA ve vysoké kvalitě. Nejvhodnější období pro odběr rostlinného materiálu je jarní období, kdy lze odebírat pupeny nebo mladé listy. Izolace z vyzrálých listů z důvodu vyššího obsahu fenolických látek, polysacharidů a voskového povrchu listů snižuje kvalitu i kvantitu izolované DNA, což může značně zkomplikovat průběh navazující PCR amplifikace a hodnocení velikostí amplifikovaných lokusů. Pro sledování identity původu RM je nutné odebírat vzorky pro analýzy ve stejném roce sklizně osiva, z důvodu každoročně měnících se opylovacích poměrů způsobujících vznik geneticky odlišného potomstva. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby mezi nimi nedošlo k záměně. Vzorky se při odběru označí, uloží do mikroténového sáčku a udržují se při nízké teplotě (ideálně 4 °C, lze využít např. chladové tašky s namraženými destičkami) a co nejrychleji se přepraví ke zpracování v laboratoři. Vzhledem k následným analýzám je důležité rostlinné vzorky držet stále při nízké teplotě. DNA lze izolovat okamžitě z takto čerstvě odebraných vzorků. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu

(zaevidování, nastříhání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do -20 °C. Další možnosti, jak uchovat vzorky, je jejich vysušení mrazem za pomoci lyofilizátoru a jejich následné vzduchotěsné uzavření v nádobách (lze použít plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Lyofilizovaný rostlinný materiál lze skladovat při pokojové teplotě a je snadněji zpracovatelný při následném tření vzorků, kdy odpadá nutnost držet vzorky před homogenizací na ledu. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrch AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím DNeasy Plant Mini Kitu:

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg, rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RNázyA, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2–3× převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 µl pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm.
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
6. Přidáme pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasáváním a vypouštěním z mikropipety vzniklou směs promícháme.
7. Odpipetujeme 650 µl směsi a přemístíme do DNeasy Mini spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.

8. DNeasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 μ l pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500 μ l pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně DNeasy Mini spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme DNeasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 μ l AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu DNeasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8000 rpm.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifiká-
tů. U izolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/ μ l a čistotu na základě poměru
absorbancí při 260 nm a 280 nm spektrofotometrem na mikro objemy. Hodnoty
pro optimální čistotu by se měly pohybovat v rozmezí 1,7–1,9, nižší nebo vyšší
hodnoty indikují přítomnost dalších nežádoucích látek (např. proteinů, fenolic-
kých látek). Vzorky DNA s koncentrací nad 50 ng/ μ l je vhodné pro optimální prů-
běh PCR amplifikace naředit AE puftrem na koncentraci 20–30 ng/ μ l.

b Postupy PCR amplifikace

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) – jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo pro účely kontrolního systému vybráno 9 optimálně polymorfních jaderných mikrosatelitových markerů. Sekvence jejich primerů byly čerpány z literárních zdrojů, u markerů FS1-03, FS1-15 z publikace PASTORELLI et al. (2003), mfc 5, mfc 7 z publikace VORNAM et al. (2004), u markeru sfc0036 z publikace ASUKA et al. (2004), u markeru csolfagus-31 z publikace LEFÈVRE et al. (2012), u markerů Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, Fagsyl-002929 z publikace PLUESS et al. (2013), viz Tab. 1. Vybrané mikrosatelity jsou složeny z dinukleotidových motivů, kromě markerů Fagsyl-000905 a Fagsyl-002929, které mají trinukleotidové motivy. Pro získání amplifikačních produktů těchto lokusů byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR). Z důvodů časových i finančních úspor byly PCR amplifikace 9 vybraných mikrosatelitových lokusů podle velikostí alel sestaveny do dvou multiplexů. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce, DNA polymerázu pipetujeme do směsi jako poslední reakční složku a to způsobem, že ji vyjme z mrazicího boxu (-20 °C) jen na nutnou dobu aplikace.

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokus/ motiv repete	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
mfc 5	F: ACTGGGACAAAAAACAAAA R: GAAGGACCAAGGCACATAAA	271–325
mfc 7	F: AAAATACACTGCCCCAAAA R: CAGGTTTTGGTTTCTTACAC	100–138
FS1-03	F: CACAGCTTGACACATTCCAAC R: TGGTAAAGCACTTTTTCCCACT	76–126
FS1-15	F: TCAAACCCAGTAAATTTCTCA R: GCCTCAATGAACTCAAAAAAC	88–134
Fagsyl-000905	F: GATCATAGCGCCGGAATTGG R: GGTCCTCCTCCTGGTACAAC	150–171
Fagsyl-001018	F: CGAGATGGACTTCTAAGTTTTATTTC R: CGAGATGGACTTCTAAGTTTTATTTC	92–122
Fagsyl-002929	F: GCGGCGACTGGAATAATAGC R: CAATCACACGCTGCACAAAC	144–198
csolfagus-31	F: TCTATTGACACAAGAATAAGAACACC R: CTTGGCAAGAAAAGGGGATT	100–188
sfc0036	F: CATGCTTGACTGACTGTAAGTTC R: TCCAGGCCTAAAAACATTTATAG	90–128

Protokoly PCR:

Multiplex 1 (SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

Fagsyl-000905 F – 3 μ M (PET), Fagsyl-000905 R – 3 μ M

Fagsyl-001018 F – 3 μ M (6-FAM), Fagsyl-001018 R – 3 μ M

FS1-03 F – 3 μ M (NED), FS1-03 R – 3 μ M

FS1-15 F – 10 μ M (VIC), FS1-15 R – 10 μ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l napipetujeme ze zásobního roztoku primerů Fagsyl-000905 F – 3 μ l, Fagsyl-000905 R – 3 μ l, Fagsyl-001018 F – 3 μ l, Fagsyl-001018 R – 3 μ l, FS1-03 F – 3 μ l, FS1-03 R – 3 μ l, FS1-15 F – 10 μ l, FS1-15 R – 10 μ l a doplníme 62 μ l TE pufru).

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10 μ l 1M Tris – HCl a 0,2 μ l 0,5M EDTA, doplníme H₂O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) do 10 ml.

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies) s reakční směsí v celkovém objemu 15 μ l na 1 vzorek

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 $\times$ PCR Buffer, minus Mg	1,5 μ l
50 mM MgCl ₂	0,6 μ l
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 μ l
Primers mix	0,75 μ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 μ l
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich)	10,975 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

Reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 $\times$ PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou. Syntéza fluorescenčně značených primerů se objednává u komerční firmy (např. Life Technologies Czech Republic s.r.o.) na základě zasláných sekvencí nukleotidů.

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
35 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	58 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	55 sec	Elongace
1×			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Multiplex 2 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

csolfagus-31 F – 6 µM (PET), csolfagus-31 R – 6 µM
Fagsyl-002929 F – 4 µM (NED), Fagsyl-002929 R – 4 µM
mfc 5 F – 12 µM (NED), mfc 5 R – 12 µM
mfc 7 F – 6 µM (VIC), mfc 7 R – 6 µM
sfc0036 F – 6 µM (6-FAM), sfc0036 R – 6 µM

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100µM koncentrace (100 pmol µl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů csolfagus-31 F – 6 µl, csolfagus-31 R – 6 µl, Fagsyl-002929 F – 4 µl, Fagsyl-002929 R – 4 µl, mfc 5 F – 12 µl, mfc 5 R – 12 µl, mfc 7 F – 6 µl, mfc 7 R – 6 µl, sfc0036 F – 6 µl, sfc0036 R – 6 µl a doplníme 32 µl TE pufru).

Reakční směs a teplotní režim pro PCR amplifikaci 2. multiplexu jsou shodné jako u multiplexu 1.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrozkušavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladicí na PCR mikrozkušavky, chladicí destička, centrifuga, teplotní cyklovač

c Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v $0,5 \times$ TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo např. GelRed (GelRed™ Nucleic acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1 : 10 000 a po promíchání nalít do formy. Do tekutého gelu se ihned vloží hřebínky s vhodným počtem hrotů dle počtu testovaných vzorků. Ztuhlý gel se opatrně přemístí do vany pro elektroforézu, vyjmou se hřebínky a přilije se $0,5 \times$ TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se nanáší PCR amplifikáty (15 μ l) smíchané s 4 μ l pufru (gel loading buffer, Sigma-Aldrich). Pro možnost přibližného odečtení velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 μ l standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 μ l destilované vody a 2 μ l pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání elektroforézy je kolem 30 minut při napětí 60 V a dalších 120–150 minut při napětí 100 V. Po proběhlé elektroforéze se gely dokumentují pod UV zářením pomocí kamerového systému. DNA fragmenty se v gelovém nosiči projevují jako fluoreskující proužky.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, dokumentační systém s UV transluminátorem

d Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Přesné zjištění velikostí amplifikovaných fragmentů (mikrosatelitových lokusů) v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5'konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET) a PCR amplifikáty musí být před fragmentační analýzou následujícím způsobem denaturovány na jednovláknové fragmenty. Nejprve se PCR produkty jednotlivých vzorků napipetují po 1 µl do 96jamkových destiček určených pro analyzátory a pak se ke každému vzorku přidá 11 µl směsi připravené z Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ® Size standard v 2.0, Applied Biosystem). Směs se připravuje v objemech 11 µl Formamidu a 0,4 µl velikostního standardu na jeden vzorek a pomocí vortexu se krátce promíchá. Po napipetování směsi k amplifikátům se destička krátce stočí na centrifuze, aby byl roztok u dna jamky, a pak se destička inkubuje 4 minuty při teplotě 94 °C, následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i zkoumaný vzorek je do kapiláry naplňován automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserovým zářením. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, to umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů, což je z časových i finančních důvodů velmi výhodné. Pro jejich správnou identifikaci po proběhlé analýze je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti jejich alel a fluorescenčního zabarvení primerů.

Devět vybraných lokusů lze seskupit pro fragmentační analýzy do 2 běhů. První běh se skládá z PCR produktů multiplexu 1 (amplifikované lokusy Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, FS1-03, FS1-15) a druhý běh z PCR produktů multiplexu 2 (amplifikované lokusy csolfagus-31, Fagsyl-002929, mfc 5, mfc 7, sfc0036).

Hodnocení velikosti amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, který je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a příslušné špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, genetický analyzátor

e Zpracování molekulárních dat

Buk lesní má diploidní sadu chromozomů. U sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě shodné alely v případě homozygota nebo v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Pro možnost srovnání genetických struktur oddílů RM se velikosti alel z hodnocených lokusů pro sledované soubory vzorků jednotlivých oddílů statisticky zpracovávají pomocí statistických programů GenALEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) a STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Pomocí programu GenAlex 6.503 se získává ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972), grafické znázornění je umožněno pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis – PCoA). Výsledky PCoA analýz v této metodické studii jsou uvedeny v Příloze. Čím bližší je umístění souborů v kvadrantu grafu PCoA, tím jsou si srovnávané soubory geneticky příbuznější.

Pro možnost porovnání populační struktury sledovaných souborů vzorků s využitím multilokusových genetických dat se využívá Bayesianská metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4. U buku lesního se vzhledem k nízkým hodnotám F_{ST} (vzájemné diferenciaci mezi porosty) v programu nastavuje model Lock prior. Nastavení příslušnosti vzorků do sledovaných souborů jako prioritní parametr analýzy je využíváno v případech méně výrazného strukturování (HUBISZ et al. 2009). Nastavení modelu Lock prior ve Structure analýze v populačních studiích buku lesního využili např. SJÖLUND et al. (2017), HÖHN et al. (2021) a KEMBRYTĚ et al. (2021). Pro možnost identifikace genetické struktury populací se využívají různé „klastrovací (shlukovací)“ modelovací programy, např. optimální hodnotu K (počet klastrů) pro data získaná z analýzy Structure, lze zjistit pomocí web-programu STRUCTURE HARVESTER (EARL, HOLDT 2012), který je založen na implementaci metod EVANNO et al. (2005) a CLUMPP (JAKOBSSON, ROSENBERG 2007). Pro zjištění optimálního počtu klastrů u případů, kdy jsou výsledky získány odlišnými postupy analýz nebo jsou velikosti srovnávaných souborů nehomogenní, byla vyvinuta metoda CLUMPAK (KOPELMAN et al. 2015), která je základem web-programu STRUCTURE SELECTOR (LI, LIU 2018). Identita sledovaných souborů vzorků se zjišťuje porovnáním barevně odlišných proporcí jednotlivých klastrů získaných jako výsledek populační analýzy Structure (grafické vyjádření Bar plot), tato metoda byla využita pro zjištění genetických struktur porovnávaných souborů buku lesního (viz Příloha). Na obr. 4. je znázorněné, že porovnávané soubory vzorků 7 oddílů se strukturovaly do 6 barevně odlišných profilů, podíly jednotlivých barev byly pro každý ze 7 sledovaných oddílů jiné. Výrazně odlišnou genetickou strukturu má oddíl 1 (převaha růžového klastru; podíl zastoupení tohoto klastru ve sledovaných souborech A – C je 49,1 – 60,7 %), oddíl 3 (převaha žlutého klastru,

podíl ve sledovaných souborech A – C 71,4 – 65,8 %), oddíl 5 (převaha světle modrého klastru, podíl ve sledovaných souborech A – C 70,4 – 69,9 %), oddíl 7 (převaha tmavě modrého klastru, podíl ve sledovaných souborech A – C 69 – 75,6 %) a oddíl 10 s nejvyšším průměrným zastoupením červeného klastru (ve sledovaných souborech A – C 74,7 – 49,2 %). U oddílu 5 byl nejvíce zastoupen červený klastř (ve sledovaných oddílech A – C 36,4 – 31,2 %) a částečně růžový klastř (25,1 – 32,9 %), u oddílu 6 bylo zastoupení červeného klastru 50,8 – 32,1 % a růžového klastru (ve sledovaných oddílech A – C 29,2 – 44,1 %), u oddílu 5 se navíc ve vyšší míře objevilo zastoupení zeleného a tmavě modrého klastru. Získané profily 7 sledovaných oddílů (UJ) rozdílného původu byly mezi sebou odlišitelné.

Výsledky klastrové analýzy lze získat také pomocí web-programu STRUCTURE SELECTOR (LI, LIU 2018). Pro možnost nastavení metodického postupu sledování identity RM v praxi bylo provedeno statistické porovnání genetické struktury u souborů s třemi různými počty vzorků (tedy soubory o velikosti 60 vzorků, 30 vzorků a 20 vzorků u jednotlivých sledovaných oddílů RM buku lesního). Výsledky zpracovaného statistického zhodnocení pro soubory tří testovaných velikostí ve formě grafického zpracování genetických vzdáleností analýzou hlavních koordinát PCoA a grafického zpracování výsledku analýzy Structure (procentuální porovnání proporcí jednotlivých klastřů ve sledovaných souborech a zjištění jejich podobnosti) jsou uvedeny v příloze (Obr. 1–6). Z přiložených hodnocení jsou nejvíce vypovídající výsledky k rozlišení zdrojů RM získané analýzou 60 jedinců ve srovnávaných souborech, což je ve shodě s obecnými principy populační genetiky, jako dostačující lze na základě provedené studie uznat i výsledky (odlišené zdroje RM) získané analýzou 30 jedinců ve srovnávaných souborech.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

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 ES je povinná 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 ČR je stávající systém kontroly odkázán na přísný dohled zaměřený na evidenci a kontrolu pohybu RM. K případům porušování ustanovení legislativních pravidel může docházet prakticky ve všech fázích procesu, počínajícího volbou zdroje pro sklizeň plodů nebo osiva, jeho využíváním pro sběr a dále ve všech fázích procesu počínaje sklizní až po výsev nebo výsadbu semenáčků či sazenic. V této souvislosti může docházet k porušování předpisů i ve vedení povinné evidence. Evidence nemusí být buď vedena vůbec, nebo je neúplná či dokonce nesprávná, a to buď z neznalosti předpisů, z nedbalosti, nebo v extrémním případě může dojít i k úmyslné falzifikaci (ŠINDELÁŘ 2000). V procesu nakládání s RM lesních dřevin v ČR byly v průběhu prováděných kontrol a dozoru pověřenou osobou ÚHÚL zjištěny nedostatky typu: nestandardně vystavená potvrzení o původu, chyby v předkládaných hlášení dodavatelů o reprodukčním materiálu v držení a uváděném do oběhu, nestandardní množství reprodukčního materiálu získaná z uznaných jednotek, nepředložená hlášení dodavatelů, 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. Mezi objektivní metody v současnosti patří DNA analýzy využívané jako nejdůvěryhodnější a nejspolehlivější postupy např. v kriminalistických laboratořích či pro určování biologické příbuznosti. Metody DNA analýz pro ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu buku lesního v průběhu sledování identity semenného materiálu od sběru osiva až po dopěstování sazenic jsou tedy vhodným doplňujícím nástrojem pro zavedený systém kontroly a dozoru nakládání s RM.

Novost postupů pro možnost ověření genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) buku lesního v různých fázích zpracování spočívala ve výběru 9 optimálně polymorfních nSSR markerů (Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, FS1-03, FS1-15, csolfagus-31, Fagsyl-002929, mfc 5, mfc 7, sfc0036) a jejich ověření na souborech vzorků získaných v poloprovozních podmínkách. Jedná se o SSR markery vykazující střední genetickou variabilitu, ale projevující dostatečnou variabilitu na úrovni porovnávaných souborů RM. Amplifikace vybra-

ných 9 lokusů byly sestaveny do dvou multiplexů, fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru probíhaly ve dvou bázích.

Na základě provedených vyhodnocení souborů s různými počty jedinců (60, 30, 20) v porovnávaných souborech lze konstatovat, že počet jedinců umožňující potvrdit shodu v populační struktuře je 60, s tím, že orientační vypovídající výsledky lze dosáhnout i při snížení počtu analyzovaných jedinců ve srovnávaných souborech na 30. Toto zjištění je v souladu s analýzami provedenými u smrku ztepilého, borovice lesní (MÁCHOVÁ et al. 2021; MÁCHOVÁ et al. 2022). Stanovení minimálního počtu analyzovaných jedinců pro aplikaci postupů DNA analýz bylo realizováno s ohledem na ekonomickou proveditelnost prověření sporných případů identity RM pomocí DNA analýz.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Zpracované metodické postupy analýz DNA s využitím vybraných vhodně polymorfních mikrosatelitových markerů lze využít při ověřování genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) buku lesního v různých fázích procesu nakládání s RM.

Zákon 149/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin – RM) zavedl povinnost orgánů veřejné správy a pověřené osoby kontrolovat dodržování tohoto zákona, tato povinnost vychází ze směrnice Rady 1999/105/ES. Každá členská země ES 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). V ČR je stávající systém kontroly odkázán na přísný dohled zaměřený na evidenci a kontrolu pohybu RM, pověřenou osobou ČR pro provádění kontroly reprodukčního materiálu je ÚHŮL, Brandýs nad Labem. Zpracované postupy DNA analýz uplatnitelné při ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu buku lesního v průběhu zpracování semenné suroviny až po dopěstování sazenic jsou vhodným doplňujícím nástrojem pro používaný systém kontroly procesu nakládání s RM, tyto postupy mohou být využity státní správou a pověřenou osobou (ÚHŮL, Brandýs nad Labem) při provádění kontrolní činnosti. Respektování ustanovení o získávání, pěstování a nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin, tak jak je uvedeno v platných právních předpisech České republiky, je jednou z podmínek a předpokladů řádného hospodaření v lesích. Volba vhodného reprodukčního materiálu, evidence a jeho používání v souladu s platnými předpisy je základem hodnoty budoucích lesů (ŠINDELÁŘ 2000). Možnost objektivní kontroly deklarovaného původu RM lesních dřevin zvýší spotřebitelskou ochranu vlastníků lesa a producentů sazenic.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Byly zvoleny mikrosatelitové markery s optimální mírou polymorfismu, které byly odzkoušeny v provedené poloprovozně založené studii u souborů vzorků rostlinného materiálu ze 7 zdrojů reprodukčního materiálu (UJ) buku lesního (Tab. 1, 2). V příloze jsou uvedeny i příklady grafických výstupů ukazující na podobnost genetických struktur šetřených souborů vzorků buku lesního ze sledovaných UJ (Obr. 1–6). Možnosti uplatnění postupů DNA analýz v jiných laboratořích může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení pro fragmentační analýzy, zejména genetického analyzátoru. Fragmentační analýzy si však lze objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme, Genomac, BIOCEV).

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Kvalitní zdroj reprodukčního materiálu s vhodným původem je nejlevnějším a neefektivnějším prostředkem podpory kvality, vitality a stability lesních porostů. Nerespektování zásad správné lesnické praxe, spočívající v zalesňování sazenicemi z nekvalitních zdrojů a (nebo) nevhodného původu se v lesních porostech projevuje celá desetiletí. Vzniklé ztráty na produkci a zvýšené náklady na ochranu nebo předčasnou obnovu porostů z nekvalitních zdrojů musí pak nést vlastníci lesa. V případě rozsáhlejších problémů pak náklady na jejich sanaci nesou veřejné zdroje a stát. Okamžitá úspora při pořízení levných sazenic ze zdrojů pochybné kvality anebo původu je přitom zcela zanedbatelná ve srovnání s komplikacemi, které jejich použití následně v takto založených porostech způsobí (GÖMÖRY, LONGAUER 2014).

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů, které umožní realizovat kontroly procesu nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin, založené na objektivním přístupu, je přínos celospolečenský. Možnost důsledné kontroly realizace ustanovení obsažených v zákoně 149/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů má zabezpečit, aby výsledkem obnovy a zalesňování byly hospodářsky hodnotné lesní porosty, stabilní, zdravotně vyhovující z hlediska produkce kvalitního dřeva i se zřetelem na žádoucí ekologické a sociální funkce lesů. Současně dojde i k dalšímu naplňování požadavků směrnice Rady 1999/105/ES. Vedle celospolečenských přínosů se dá předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů bukových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu potvrzeného původu.

Buk lesní je v našich podmínkách z hlediska svého hospodářského uplatnění důležitý druh dřeviny, který významným způsobem ovlivňuje ekonomiku řady lesních majetků všech forem vlastnictví, a tedy i celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-dřevařského sektoru) a z hlediska dalších aspektů lesnického hospodaření má značný potenciál do budoucna pro zvýšení stability, vitality a diverzity lesních porostů. V současnosti vzhledem k probíhajícím klimatickým změnám, kůrovcové kalamitě a s tím spojené potřebě zvýšit biodiverzitu lesních porostů, význam buku lesního v lesním hospodářství silně vzrůstá. Ekonomický přínos využití kvalitních reprodukčních zdrojů pro reprodukci porostů buku lesního byl vyčíslen v roce 2016 (CVRČKOVÁ et al. 2016). Vzhledem k současné kalamitní situaci u lesních porostů (poškození suchem, škůdci) byla vstupní data pro výpočet ekonomického přínosu aktualizována.

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že bude v době mýtní zralosti lesních porostů dosaženo současně i vyšší objemové produk-

ce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýti u bukových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním bukovým porostům na území ČR zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu činí v objemovém vyjádření cca 95,7 m³/ha a jednoznačně reprezentuje lepší produkční bázi v genových základnách.

Zlepšená genetická produkční báze zvyšuje kvantitativní těžební potenciál a přispívá tím ke zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů, což je jeden z cílů Národního lesnického programu II (2012).

Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná cena surového dříví za ČR, která reprezentuje cenu dřeva na pni, tj. cenu surového dříví na odvozním místě po odečtení těžebních nákladů, a která je každoročně zveřejňována ve Věstníku MZe, odráží značnou měrou i dominantní pozici dřeviny smrk na trhu se surovým dřívím, nebylo v případě kalkulací u buku metodicky zcela odůvodněné použití této průměrné ceny surového dříví k ekonomickým výpočtům, protože by došlo k nadhodnocení výsledků. Z tohoto důvodu byla kalkulace ekonomického přínosu u buku ze zvýšeného objemu obchodovatelného dříví konstruována na základě:

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

Při dlouhodobě dosahovaném celostátním průměrném podílu sortimentů surového dříví v dodávkách listnatého dříví (pilařská kulatina 30,6 %, vláknina a ostatní průmyslové dříví 25,4 % a palivové dříví 44 %) a při ceně surového dříví za rok 2021 ve výši 1990 Kč/m³ za pilařskou kulatinu III. tř. jakosti A/B, 1106 Kč/m³ za dříví V. tř. jakosti pro výrobu buničiny a 1132 Kč/m³ za palivové dříví, činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších bukových porostů v GZ v době obmýti částku 132 826 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 41 438 Kč/ha (průměrné celostátní náklady činí 433 Kč/m³) pak představuje zvýšený čistý výnos ve výši 91 388 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob bukových porostů. Vypočtený výsledný ekonomický efekt (zvýšený čistý výnos) ze smýceného lesního porostu v době obmýti však můžeme označit za pesimistickou variantu výpočtu.

Při optimistické variantě výpočtu, pokud budeme vycházet z reálné situace na řadě lesních majetků, kdy v závislosti na kvalitě těžebního fondu lze dosáhnout i vyšších podílů pilařské kulatiny v dodávkách surového dříví než je celostátní průměr, tj. více než 28 %, a při současném použití těžebních nákladů v místě a čase obvyklých, odpovídajících nižším nákladům vztaženým jen k těžbě mýtně zralých listnatých porostů, by se výsledný ekonomický efekt ještě výrazněji projevil ve vyšším hospodářském výsledku (zisku) vlastníků lesa. Dále, vyšší celková objemová produkce porostů z kvalitních genetických zdrojů se neprojeví v ekonomice vlastníků lesa pouze v době obmytí, ale již také v rámci výchovných opatření v podobě zlepšení (zvýšení) cash flows z provedených probírek, což rovněž pozitivně ovlivní ekonomickou situaci vlastníků lesa a přispěje k podpoře ekonomického pilíře trvale udržitelného hospodaření v lese.

Je nutno rovněž připomenout, že provedená kalkulace se zabývá pouze oceněním změny v kvantitativních parametrech (v objemu). Jen z důvodu současné neznalosti řady potřebných ekonomických veličin nejsou do výpočtů zařazeny také další do-datečné ekonomické efekty vyplývající z lepších kvalitativních parametrů porostů, které by se projeví např. v lepší sortimentaci těžebního fondu a v následném vyšším zpeněžení surového dříví.

Kalkulace ekonomického přínosu (tzv. „genetického zisku“) byla provedena na základě následujících informačních zdrojů:

- Analýza datového skladu ÚHÚL - DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2022)
- Lesnictví 2021, katalog produktů, dodávky listnatého dříví za období 2012–2021, tabulka č. 2.13, Český statistický úřad, Praha, 2022
- Indexy cen v lesnictví (surové dříví) – průměrné ceny surového dříví pro tu-zemsko za ČR v roce 2021 (Kč/m³), tabulka 5 – vlastníci, Český statistický úřad, Praha, 2022
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2020, Ministerstvo zemědělství, Praha 2021, ISBN 978-80-7434-242-4

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem vlastnictví laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jedince jsou průměrné náklady 118,- Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 9 lokusů přibližně 170,-Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz ve dvou multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2022 a je nutné zmínit, že cena chemikálií se postupně navyšuje.

V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. Pro případné využití služeb komerčních laboratoří je možné se obrátit například na společnosti SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV, které disponují potřebnou vybaveností.

VI DEDIKACE

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1810129.

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ASUKA Y., TANI N., TSUMURA Y., TOMARU N. 2004. Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes*, 4: 101–103.
- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- CUERVO-ALARCON L., AREND M., MÜLLER M., SPERISEN C., FINKELDEY R., KRUTOVSKY K. V. 2018. Genetic variation and signatures of natural selection in populations of European beech (*Fagus sylvatica* L.) along precipitation gradients. *Tree Genetics & Genomes*, 14: 1–21.
- 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.
- EVANNO G., REGNAUT S., GOUDET J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567–1587.
- 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.
- GÖMÖRY D., LONGAUER R. 2014. Lesnická genetika, Mendelova univerzita v Brně, studijní materiál, Brno, 137 s.
- HASENKAMP N., ZIEGENHAGEN B., MENGEL C., SCHULZE L., SCHMITT H-P., LIEPELT S. 2011. Towards a DNA marker assisted seed source identification: a pilot study in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Research*, 130: 513–519.
- HÖHN M., MAJOR E., AVDAGIĆ A., BIELAK K., BOSELA M., COLL L., DINCA L., GIAMMARCHI F., IBRAHIMPAHIĆ A., MATARUGA M., PACH M., UHL E., ZLATANOV T., CSEKE K., KOVÁCS Zs., PALLA B., LADÁNYI M., HEINZE B. 2021. Local characteristics of the standing genetic diversity of European beech with high within-region differentiation at the eastern part of the range. *Canadian Journal of Forest Research*, 51: 1791–1798.

- 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: 1322–1332.
- JAKOBSSON M., ROSENBERG N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801–1806.
- JANKOVIĆ I.K., NONIĆ M., DEVETAKOVIĆ J., IVETIĆ V., ŠIJAČIĆ-NIKOLIĆ M., ALEKSIĆ J.M. 2019. Technical overview of nuclear microsatellites for *Fagus* sp., and their utility in *F. sylvatica* from the central Balkans (Serbia). *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34: 545–556.
- KEMBRYTĖ R., DANUSEVIČIUS D., BUCHOVSKA J., BALIUCKAS V., KAVALIUSKAS D., FUSSI B., KEMPF M. 2021. DNA-based tracking of historical introductions of forest trees: the case of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in Lithuania. *European Journal of Forest Research*, 140: 435–449.
- KEMPF M., KONNERT M. 2016. Distribution of genetic diversity in *Fagus sylvatica* at the north-eastern edge of the natural range. *Silva Fennica*, 50: 1663.
- 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.
- KOPELMAN N.M., MAYZEL J., JAKOBSSON M., ROSENBERG N.A., MAYROSE I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15: 1179–1191.
- KOTRLA P., PAŘÍZEK M. 2008. Kontrola dodavatelů RM prováděná ze strany ÚHÚL. *Lesnická práce*, 87 (10): 26–27.
- LEFÈVRE S., WAGNER S., PETIT R.J., DE LAFONTAINE G. 2012. Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. *Molecular Ecology Resources*, 12: 484–491.
- 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.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- ODDOU-MURATORIO S., KLEIN E.K., VENDRAMIN G.G., FADY B. 2011. Spatial vs. temporal effects on demographic and genetic structures: the roles of dispersal, mast seeding and differential mortality on patterns of recruitment in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, 20: 1997–2010.

- PASTORELLI R., SMULDERS M.J.M., VAN'T WESTENDE W.P.C., VOSMAN B., GIANNINI R., VETTORI C., VENDRAMIN G.G. 2003. Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology*, 3: 76–78.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- PIOTTI A., LEONARDI S., BUIVEVELD J., GEBUREK T., GERBER S., KRAMER K., VETTORI C., VENDRAMIN G.G. 2012. Comparison of pollen gene flow among four European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations characterized by different management regimes. *Heredity*, 108: 322–331.
- PLUESS A.R., MÄÄTTÄNEN K. 2013. Characterization of eighteen novel microsatellite markers and multiplex PCR protocol for *Fagus sylvatica*. *Conservation Genetics Resources*, 5: 311–314.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- REDI E.L., GISMONDI A., BRAGLIA R., SCUDERI F., CANINI A. 2019. Genetic structure and phylogeographic relationships of *Fagus sylvatica* L. woods in Lazio (Central Italy). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153: 624–628.
- SJÖLUND M.J., JUMP A.S. 2015. Coppice management of forests impacts spatial genetic structure but not genetic diversity in European beech (*Fagus sylvatica* L.), *Forest Ecology and Management*, 336: 65–71.
- SJÖLUND M.J., GONZALEZ-DIAZ P., MORENO-VILLENA J.J., JUMP A.S. 2017. Understanding the legacy of widespread population translocations on the post-glacial genetic structure of the European beech, *Fagus sylvatica* L. *Journal of Biogeography*, 44: 2475–2487.
- ŠINDELÁŘ J. 2000. Možné důsledky porušování zákona o lesích a dalších normativních ustanovení při nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 45 (3): 37–41.
- TSIPIDOU O., LEINEMANN L., KORAKIS G., FINKELDEY R., GAILING O., PAPAGEORGIOU A.C. 2021. Fine-scale spatial patterns of the genetic diversity of

European beech (*Fagus sylvatica* L.) around a mountainous glacial refugium in the SW Balkans. *Forests* 12 (6): 725.

VORNAM B., DECARLI N., GAILING O. 2004. Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 5: 561–570.

ZÁDRAPOVÁ D., KORECKÝ J., DVOŘÁK J., FALTINOVÁ Z., BÍLÝ J. 2020. Microsatellite analysis of genetic diversity in Czech populations of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Forestry Studies*, 73: 64–76.

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2016. Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 8: 35 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O. 2017. Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. Journal of Forest Science, 63 (2): 53–61.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., CAFOUREK J., ŠIMERDA L. 2021. Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu smrku ztepilého. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 13: 39 s.
- 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.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O. 2022. Využití DNA markerů pro kontrolu deklarovaného původu reprodukčního materiálu borovice lesní. Zprávy lesnického výzkumu 67: 259–268.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., VÍTOVÁ K., CAFOUREK J., ŠIMERDA L. 2022. Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu borovice lesní. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce 9: 39 s..

METHODOLOGY OF USING DNA MARKERS FOR THE SYSTEM OF CONTROL OF DECLARED ORIGIN OF REPRODUCTIVE MATERIAL OF EUROPEAN BEECH

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 and on the base of international legislation (Council Directive 1999/105/EC on the marketing of forest reproductive material on the market) has the obligation to create a functioning control system for determination of forest reproductive material. 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 this methodology is to present the possibilities of using objective methods of DNA analysis to verify the declared origin of reproductive material of European beech in terms of the Czech Republic. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The methodological procedures based on a study of monitoring of the genetic identity of reproductive material were carried out during four years, i.e. from the seeds to transplanted plants production. DNA analyses were performed on 1244 samples of plant material from 7 selected sources of reproductive material. Sampling of reference samples was carried out from the sets and units of reproductive material listed in Table 2. From each of 7 reproductive material units there were analysed 60 samples from seeds, 60 samples from seedling production and 60 samples from transplanted plants. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands). The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Nine polymorphic markers (Fagsyl-000905, Fagsyl-001018, FS1-03, FS1-15, csolfagus-31, Fagsyl-002929, mfc 5, mfc 7, sfc0036) with sufficient informative

values were selected for the evaluation of the genetic structure of the monitored sets of European beech reproductive material by Bayesian clustering. 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 GenAlEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) and 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. The primer sequences of the studied markers are reported in Table 1. Nei's genetic distances among European beech sample sets, constructed on the basis of principal coordinate analysis (PCoA), are shown in Figs. 1–3. The structuring of investigated European beech sample sets was also confirmed by various proportions of genetic profiles according to the Bayesian clustering method results (Fig. 4, 5 and 6). Using the performed Structure analysis, the obtained profiles of 7 monitored units of reproductive material (3 sample sets -- A, B, C from one units) of different origin were distinguishable from each other. According to the performed evaluations of sets with different sample numbers (60, 30, 20) in the compared sets, it can be declared that the recommended number of samples to confirm agreement in population structures is 60 (Fig. 1 and 4). Based on a high statistical significance of the obtained results this sample number enables to make qualified decisions on identity and verifying of declared origin of European beech reproductive material. Thus, these methodological procedures could be used in state control systems of forest reproductive material origin, and to increase consumer protection of forest owners and nursery producers in the Czech Republic.

PŘÍLOHA

**Příklady výstupů genetických analýz pro nastavení systému
kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu
u buku lesního**

Tab. 2: Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků buku lesního
Overview of forest reproductive material sources and designation of European beech sample sets

Označení oddílů/ Designation of forest reproductive material source		Původ/Proof				Fáze odběru vzorku/ Sampling phase	Označení souboru vzorků/Designation of sample set
		ČÚJ/ Source of forest reproductive material	Rok zrání/ Maturation year	Lesní vegetační stupně/Forest vegetation zone	Přírodní lesní oblast/Natural forest areas		
1		CZ-2-2B-BK-06065-10-4-C-G42	2018	4. LVS	10 – Středočeská pahorkatina	semena/seed	BK_1A_OSI
						semenáčky/nursery seedlings	BK_1B_SEM
						sazenice/nursery transplanted plants	BK_1C_SAZ
3		CZ-1-2C-BK-00009-38-4-B	2018	4. LVS	38 – Bílé Karpaty a Vizovické vrchy	semena/seed	BK_3A_OSI
						semenáčky/nursery seedlings	BK_3B_SEM
						sazenice/nursery transplanted plants	BK_3C_SAZ
4		CZ-2-2A-BK-06035-10-4-C-G42	2018	4. LVS	10 – Středočeská pahorkatina	semena/seed	BK_4A_OSI
						semenáčky/nursery seedlings	BK_4B_SEM
						sazenice/nursery transplanted plants	BK_4C_SAZ
5		CZ-2-2B-BK-03454-26-4-H-G101-1	2016	4. LVS	26 – Předhoří Orlických hor	semena/seed	BK_5A_OSI
						semenáčky/nursery seedlings	BK_5B_SEM
						sazenice/nursery transplanted plants	BK_5C_SAZ
6		CZ-2-2B-BK-06065-10-4-C-G42	2018	4. LVS	10 – Středočeská pahorkatina	semena/seed	BK_6A_OSI
						semenáčky/nursery seedlings	BK_6B_SEM
						sazenice/nursery transplanted plants	BK_6C_SAZ

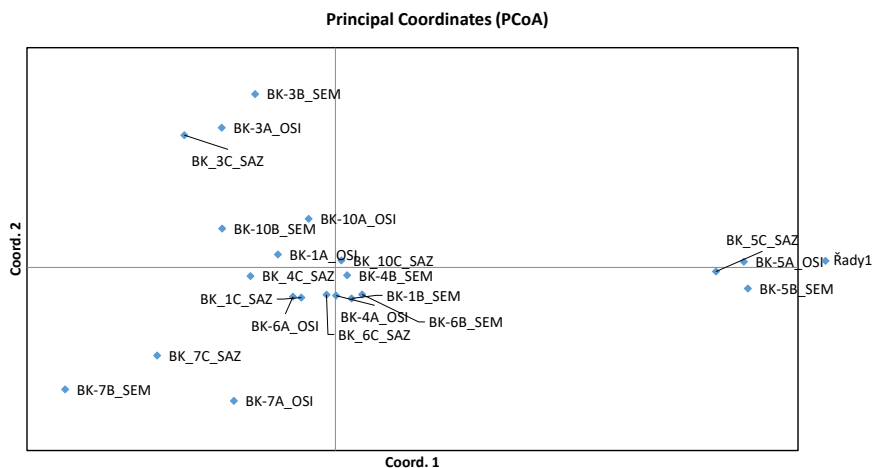
Tab. 2: Pokračování – Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků buku lesního

Continuation – Overview of forest reproductive material sources and designation of European beech sample sets

7	CZ-1-2C-BK-01004-1-6-U	2018	6. LVS	1 – Krušné hory	semena/seed	BK_7A_OSI
					semenačky/nursery seedlings	BK_7B_SEM
					sazenice/nursery transplanted plants	BK_7C_SAZ
10	CZ-2-2B-BK-00009-36-3-Z	2018	3. LVS	36 – Středomoravské Karpaty	semena/seed	BK_10A_OSI
					semenačky/nursery seedlings	BK_10B_SEM
					sazenice/nursery transplanted plants	BK_10C_SAZ

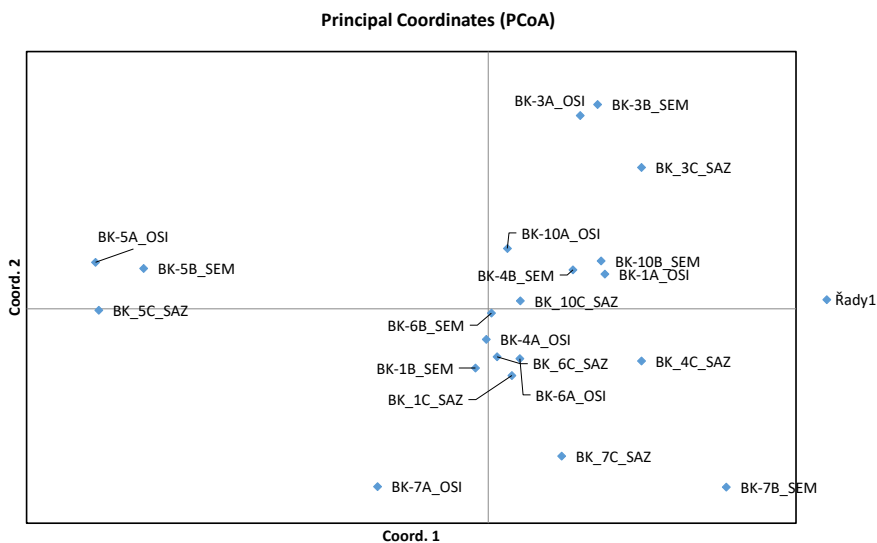
Poznámka:

Oddíly označené 2, 8 a 9 nebyly z důvodu nedostatečné velikosti souborů dat do vyhodnocovací analýzy provedené modelové studie zařazeny



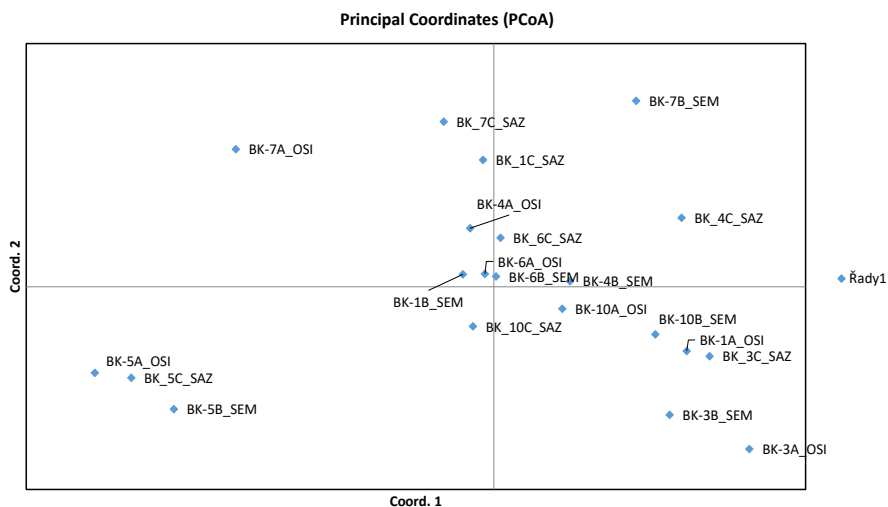
Obr. 1: Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 60 vzorků ve sledovacích souborech

Fig. 1: Results of the principal coordinate analysis (60 samples in observed sets)



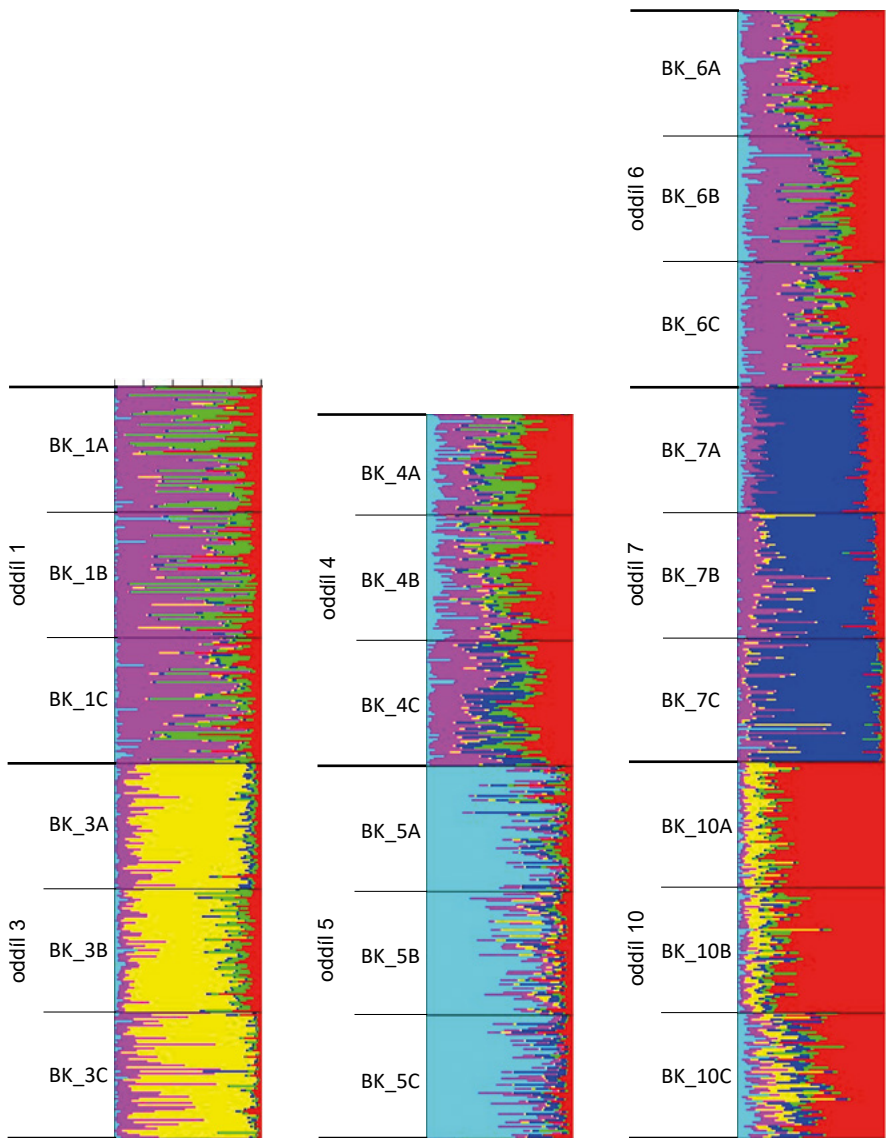
Obr. 2: Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 30 vzorků ve sledovacích souborech

Fig. 2: Results of the principal coordinate analysis (30 samples in observed sets)



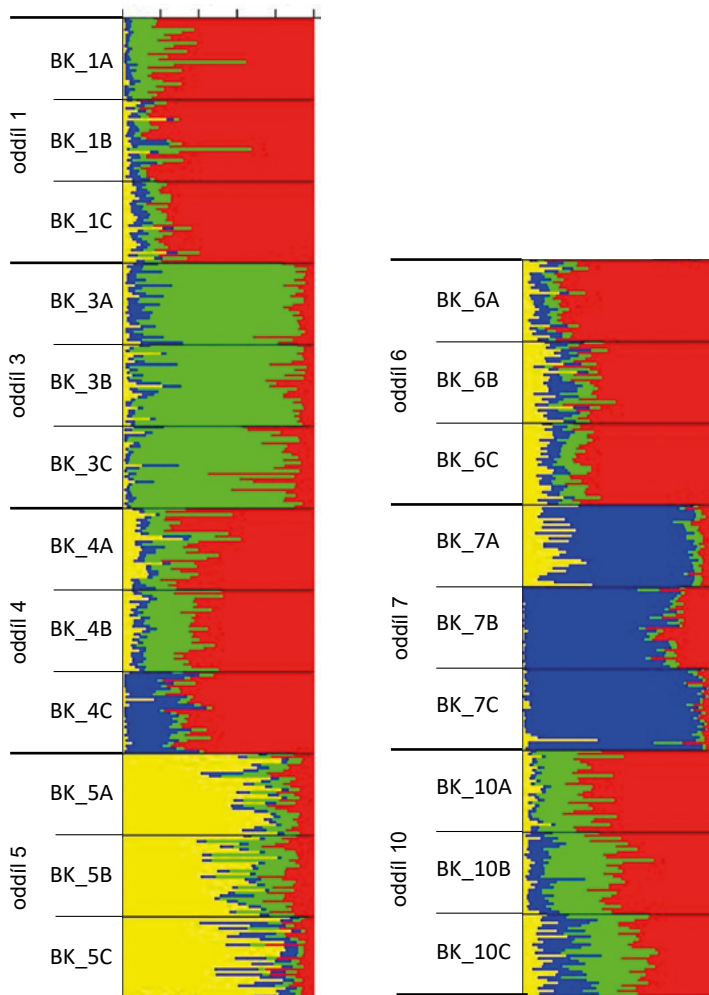
Obr. 3: Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 20 vzorků ve sledovaných souborech

Fig. 3: Results of the principal coordinate analysis (20 samples in observed sets)



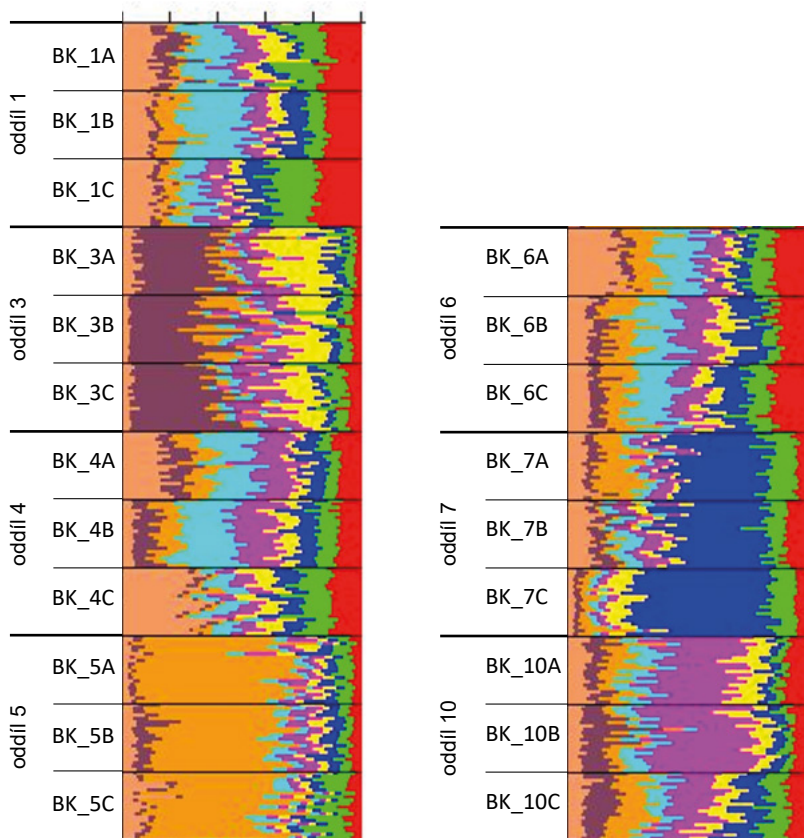
Obr. 4: Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro optimální $K = 6$ u 21 sledovaných souborů vzorků (počet vzorků v souboru 60) ze 7 různých zdrojů RM

Fig. 4: Evaluation of genetic structure by Bayesian method for optimal $K = 6$ in 21 observed sets of 60 samples from 7 different sources RM



Obr. 5: Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro optimální $K = 4$ u 21 sledovaných souborů vzorků (počet vzorků v souboru 30) ze 7 různých zdrojů RM

Fig. 5: Evaluation of genetic structure by Bayesian method for optimal $K = 4$ in 21 observed sets of 30 samples from 7 different sources RM



Obr. 6: Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro optimální $K = 9$ u 21 sledovaných souborů vzorků (počet vzorků v souboru 20) ze 7 různých zdrojů RM

Fig. 6: Evaluation of genetic structure by Bayesian method for optimal $K = 9$ in 21 observed sets of 20 samples from 7 different sources RM



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 10/2022