LESNICKÝ PRŮVODCE

# METODIKA VYUŽITÍ DNA MARKERŮ PRO SYSTÉM KONTROLY DEKLAROVANÉHO PŮVODU REPRODUKČNÍHO MATERIÁLU BOROVICE LESNÍ

**Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.**
**a kol.**

Certifikované METODIKY PRO PRAXI

**9/2022**

# Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu borovice lesní

**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.**

**Strnady 2022**

# Lesnický průvodce 9/2022

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 978-80-7417-244-1
ISSN 0862-7657

# METHODOLOGY OF USING DNA MARKERS FOR THE SYSTEM OF CONTROL OF DECLARED ORIGIN OF REPRODUCTIVE MATERIAL OF SCOTS PINE


## *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 Scots pine 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 of reproductive material identity, which was carried out during four years, i.e. from the seeds onto transplanted plants production. Analyses of selected microsatellite markers were performed on 2390 samples of the 40 sets of reproductive material from 10 selected sources of forest reproductive material (units of forest reproductive material) and the genetic compositions of sets were compared after statistical processing. 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 Bayesion 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. These methodological procedures could be used in the state control systems of verifying declared origin of Scots pine forest reproductive material, and to increase consumer protection of forest owners and nursery producers in the Czech Republic.



**Key words**: Scots pine; control systems of forest reproductive material origin

**Oponenti:** Ing. Vlasta Knorová, DiS., Ministerstvo zemědělství ČR, odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant, České Budějovice

*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.cz

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 ..... 11

c Postupy elektroforézy v agarózovém gelu ..... 16

d Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů ..... 17

e Zpracování molekulárních dat ..... 18

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ ..... 20

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY ..... 22

V EKONOMICKÉ ASPEKTY ..... 23

VI DEDIKACE ..... 25

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY ..... 26

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE ..... 29

Summary ..... 30

Příloha ..... 32

*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) borovice lesní v různých fázích zpracování, od sběru semenného materiálu až po dopěstování sadebního materiálu. Získané postupy lze následně využít v kontrolních systémech státní správy a pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a producentů sazenic.

# II VLASTNÍ POPIS METODIKY

## 1 Úvod

Umělá obnova lesa zůstává v rámci České republiky převažujícím 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. Zajištění této podmínky je spojené s potřebou evidovat horizontální i vertikální přenosy reprodukčního materiálu (RM) lesních dřevin, s cílem udržet vysokou a kvalitní hospodářskou produkci a zajistit ochranu přirozeného genofondu domácích populací. V lesním hospodářství ČR dochází každoročně k pohybu značného množství RM lesních dřevin a i z tohoto důvodu je nutné, aby oprávněné státní orgány měly k dispozici účinné metody, kterými lze podpořit či vyloučit deklarovaný původ. 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 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 (např. mikrosatelitové markery), které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Mikrosatelitové markery (SSR markery) jsou vhodné pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu borovice lesní například v semenných sadech, klonových archivech (Dzialuk, Burcik 2004; Cvrčková et al. 2017) a lze je využít pro studium genetické struktury a diverzity borových porostů (Sebastiani et al. 2012; Belletti et al. 2012; Nowakowska et al. 2014; García-Gil et al. 2015; Bernhardsson et al. 2016; Pazouki et al. 2016; Máchová et al. 2016; Zimmer et al. 2018; Tóth et al. 2019; Dering et al. 2021).

Využití biochemických markerů pro možnost kontroly identity RM lesních dřevin v průběhu procesu získávání sadebního materiálu je základem zavedeného systému ZüF-Verfahren (Behm, Konnert 2002; Konnert, Behm 2006) využívaného v Německu. Tento systém je založen na získávání a uchovávání referenčních vzorků, které umožňuje průběžné i následné porovnávání oddílů RM a dále na výběru vhodných molekulárních metod a markerů. Uvedený systém byl zpočátku nastaven na využívání izoenzymových markerů, tyto byly později nahrazeny markery s vyšší rozlišovací schopností (SSR markery). Pro možnost kontroly identity oddílů RM jsou vhodné 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 borovice lesní vybrat vhodné jaderné mikrosatelity, nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery s dostačující genetickou variabilitou, ověřit vhodnou velikost souborů vzorků pro postup odběrů referenčních vzorků při procesu provozního nakládání s RM a zpracovat vhodné postupy vyhodnocení genetických analýz. Získané metodické postupy kontroly identity RM borovice lesní 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 2390 vzorků rostlinného materiálu z 10 zdrojů reprodukčního materiálu (uznaných jednotek, UJ) borovice lesní. 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 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. Odběry je proto nutné provádět z rostlinného materiálu čerstvě narostlého v roce odběru. U borovice lesní se odebírají mladé jehlice z dostatečně narostlých semenáčků a rozpracovaného sadebního materiálu, v případě analýzy u osiva lze k izolaci DNA využít embrya. U starších jehlic se z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů snižuje kvalita i kvantita izolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR pro získání jednoznačných a reprodukovatelných amplifikovaných lokusů. Pro izolaci DNA lze odebírat i pupeny, ale jejich zpracování je při větším počtu vzorků časově náročnější. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. 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, nastřihání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do -20 °C. Další možností, jak uchovat vzorky, je jejich vysušení mrazem za pomocí lyofilizátoru a jejich následné vzduchotěsné uzavření v nádobách (lze použít plas-

tové 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 nahřívat na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrech 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 přenese se do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrcenému 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× převracením 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 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. DNeasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.

9. Přidáme dalších 500 µl 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 µl 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 8 000 rpm.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. U izolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/µl a čistotu na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm spektrofotometrem na mikroobjemy. 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, fenolických látek). Vzorky DNA s koncentrací nad 50 ng/µl je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrem na koncentraci 20–30 ng/µl.

## 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 7 optimálně polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů psyl17, psyl42, psyl57 z publikace Sebastiani et al. (2012), SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5 z publikace Soranzo et al. (1998), PtTX 3107 z publikace Belletti et al. (2012), viz Tab. 1. Mikrosatelity psyl17, psyl42 jsou složeny z dinukleotidových motivů, psyl57, PtTX 3107 z trinukleotidových motivů a markery SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5 mají repetice složené ze dvou různých dinukleotidových motivů. 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 7 vybraných mikrosatelitových lokusů podle velikostí alel a reakčních podmínek sestaveny do

dvou multiplexů kromě lokusu PtTX 3107, jehož amplifikace musí pro specifický teplotní režim PCR probíhat odděleně a až fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru lze provést společně s amplifikovanými lokusy multiplexu 1. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce, DNA polymerázu připipetujeme do směsi jako poslední reakční složku, a to způsobem, že ji vyjmeme z mrazicího boxu (-20 °C) jen na nutnou dobu aplikace.

**Tab. 1:** Vybrané mikrosatelitové lokusy, sekvence primerů a získané velikosti PCR produktů

| Lokus/ motiv repetice | Sekvence primerů (5´-3´) | Velikost PCR produktů (bp) |
|---|---|---|
| psyl17 $(TA)_7$ | F: TGG TCT GCA AAT CAA TCG AA<br>R: GGG TAG GAA TGC AAG TTA GGC | 219–245 |
| psyl42 $(TC)_9$ | F: CAA CTT CAG CCT TGC AAC AA<br>R: CGA CTT CAT TTG GAA CAC CA | 165–175 |
| psyl57 $(ACC)_7$ | F: CCC CAC ATC TCT ACA GTC CAA<br>R: TGC TCT TGG ATT TGT TGC TG | 183–207 |
| SPAG 7.14 $(TG)_{17}(AG)_{21}$ | F: TTC GTA GGA CTA AAA ATG TGT G<br>R: CAA AGT GGA TTT TGA CCG | 174–252 |
| SPAC 11.4 $(AT)_5(GT)_{19}$ | F: CTT CAC AGG ACT GAT GTT CA<br>R: TTA CAG CGG TTG GTA AAT G | 125–171 |
| SPAC 12.5 $(GT)_{20}(GA)_{10}$ | F: CTT CTT CAC TAG TTT CCT TTG G<br>R: TTG GTT ATA GGC ATA GAT TGC | 120–198 |
| PtTX 3107 $(CAT)_{14}$ | F: AAA CAA GCC CAC ATC GTC AAT C<br>R: TCC CCT GGA TCT GAG GA | 141–198 |

**Protokoly PCR:**

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

psyl17 F – 12 μM (PET), psyl17 R – 12 μM

SPAC 11.4 F – 12 μM (6FAM), SPAC 11.4 R – 12 μM

Forward (F) i revers (R) primery naředíme 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 psyl17 F – 12 µl, psyl17 R – 12 µl, SPAC 11.4 F – 12 µl, SPAC 11.4 R – 12 µl a doplníme 52 µl TE pufru).

Příprava TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8.0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10 µl 1M Tris – HCl a 0,2 µl 0,5M EDTA, doplníme $H_2O$ (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 µl na 1 vzorek

| **Reakční směs** | **Objem na 1 vzorek** |
|---|---|
| 10 x PCR Buffer, minus Mg | 1,5 µl |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0,6 µl |
| 10 mM dNTPs (2,5 mM each) | 0,3 µl |
| Primers mix | 0,75 µl |
| Polymerase Platinum Taq | 0,075 µl |
| $H_2O$ (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) | 10,775 µl |
| Přidat 1 µl templátové DNA | |

Reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 × 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 zaslaných sekvencí nukleotidů.

Teplotní režim PCR

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

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

psyl42 F – 1 µM (VIC), psyl42 R – 1 µM

psyl57 F – 5 µM (NED), psyl57 R – 5 µM

SPAC 12.5 F – 3 µM (6-FAM), SPAC 12.5 R – 3 µM

SPAG 7.14 F – 5 µM (VIC), SPAG 7.14 R – 5 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 psyl42 F – 1 µl, psyl42 R – 1 µl, psyl57 F – 5 µl, psyl57 R – 5 µl, SPAC 12.5 F – 3 µl, SPAC 12.5 R – 3 µl, SPAG 7.14 F – 5 µl, SPAG 7.14 R – 5 µl a doplníme 72 µl TE pufru).

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

| **Reakční směs** | **Objem na 1 vzorek** |
|---|---|
| 10× PCR Buffer, minus Mg | 1,5 µl |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0,6 µl |
| 10 mM dNTPs (2,5 mM each) | 0,1 µl |
| Primers mix | 0,75 µl |
| Polymerase Platinum Taq | 0,075 µl |
| $H_2O$ (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich) | 10,775 µl |
| Přidat 1 µl templátové DNA | |

Teplotní režim PCR

| Krok | Teplota | Čas | Popis |
|---|---|---|---|
| 1. | 94 ºC | 3 min | Počáteční denaturace |
| 35× opakovat od 2. do 4. kroku | | | |
| 2. | 94 ºC | 45 sec | Denaturace |
| 3. | 59 ºC | 45 sec | Annealing |
| 4. | 72 ºC | 45 sec | Elongace |
| 1× | | | |
| 5. | 72 ºC | 20 min | Finální elongace |
| 6. | 4 ºC | Úložná teplota | Chlazení amplifikátů |

Lokus PtTX 3107

PtTX 3107 F – 5 µM (NED), PtTX 3107 R – 5 µM

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100µM koncentrace (100 pmol/µl) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme roztok z forward a revers primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 µl napipetujeme ze zásobních 100 µM roztoků primerů: PtTX 3107 F – 5 µl, PtTX 3107 R – 5 µl a doplníme 90 µl TE pufru).

Postup přípravy reakční směsi je stejný jako u multiplexu 2.

Teplotní režim PCR

| Krok | Teplota | Čas | Popis |
|---|---|---|---|
| 1. | 95 ºC | 3 min | Počáteční denaturace |
| 30× opakovat od 2. do 4. kroku | | | |
| 2. | 95 ºC | 45 sec | Denaturace |
| 3. | 57 ºC | 59 sec | Annealing |
| 4. | 72 ºC | 45 sec | Elongace |
| 1× | | | |
| 8. | 72 ºC | 20 min | Finální elongace |
| 9. | 4 ºC | úložná teplota | Chlazení amplifikátů |

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrozkumavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladicí na PCR mikrozkumavky, 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 × 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, 10,000XinWater, 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 × TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se nanáší PCR amplifikáty (15 µl) smíchané s 4 µl pufru (gel loading buffer, Sigma-Aldrich). Pro přibližné odečtení velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 µl standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 µl destilované vody a 2 µl 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, kde se DNA fragmenty 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 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.

Sedm vybraných lokusů lze seskupit pro fragmentační analýzu do 2 běhů. První běh se skládá z PCR produktů multiplexu 1 (amplifikované lokusy psyl17, SPAC 11.4) a amplifikovaného lokusu PtTX 3107, druhý běh z PCR produktů multiplexu 2 (amplifikované lokusy psyl42, psyl57, SPAC 12.5, SPAG 7.14).

Hodnocení velikosti amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, jenž 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

Borovice 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). 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 borovice lesní se vzhledem k nízkým hodnotám $F_{ST}$ (vzájemné diferenciace 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 borovice lesní využili např. Tóth et al. (2019), Sofletea et al. (2020). 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 souboru vzorků se zjišťuje porovnáním barevně odlišných proporcí jednotlivých klastrů získaných jako výsledek populační analýzy Structure (grafické vyjádření Bar plot), případně lze využít výsledky klastrové analýzy získané pomocí web-programu STRUCTURE SELECTOR (Li, Liu 2018). Web program STRUCTURE SELECTOR byl využit i pro zjištění genetických struktur porovnávaných souborů borovice lesní (viz příloha). Na obr. 4. je znázorněné, že porovnávané soubory vzorků 10 oddílů se strukturovaly do 5 barevně odlišných profilů, podíly jednotlivých barev byly pro každý z 10 sledovaných oddílů jiné. Výrazně odlišnou genetickou strukturu mají oddíl 1 (převaha fialového klastru), oddíl 3 (převaha zeleného klastru), oddíl 4 (převaha modrého klastru),

oddíl 6 (vysoké zastoupení oranžového klastru) a oddíl 10 s nejvyšším průměrným zastoupením červeného klastru. U oddílu 5 byl nejvíce zastoupen červený klastr a částečně zelený klastr. U oddílu 8 je patrné vysoké zastoupení modrého klastru a následně fialového klastru, u oddílu 9 byl nejvíce zastoupen modrý klastr a částečně oranžový klastr. U oddílů 2 a 7 bylo vysoké zastoupení červeného a dále oranžového klastru, ale v jiných poměrech. Získané profily 10 sledovaných oddílů (UJ) rozdílného původu byly mezi sebou odlišitelné.

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 borovice lesní). 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 klastrů 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 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. 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 hlášeních 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, Paříček 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 borovice lesní v průběhu sledování identity semenného materiálu od sběru osiva až po dopěstování sazenic jsou tedy vhodným doplňujícím nástrojem pro zavedený systém kontroly a dozoru nakládaní s RM.

Novost postupů pro možnost ověření genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) borovice lesní v různých fázích zpracování spočívala ve výběru 7 optimálně polymorfních nSSR markerů (psyl17, psyl42, psyl57, SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5, PtTX 3107) a jejich ověření na souborech vzorků získaných v poloprovozních podmínkách. Jedná se o SSR markery vykazující střed-

ní genetickou variabilitu, ale projevující dostatečnou variabilitu na úrovni porovnávaných souborů RM. Amplifikace vybraných 7 lokusů byly sestaveny do dvou multiplexů a jeden lokus má specifickou PCR, fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru probíhaly ve dvou bězích.

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 (Máchová et al. 2021) 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) borovice lesní 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 prováděním kontroly reprodukčního materiálu je ÚHÚL. Zpracované postupy DNA analýz uplatnitelné při ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu borovice lesní v průběhu zpracování semenné suroviny až po dopěstování sazenic jsou vhodným doplňujícím nástrojem pro používaný systém kontroly procesu nakládaní s RM, tyto postupy mohou být využity státní správou a pověřenou osobou ÚHÚL 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 z 10 zdrojů reprodukčního materiálu (UJ) borovice lesní (Tab. 1, 2). V příloze jsou uvedeny i příklady grafických výstupů, ukazující na podobnost genetických struktur šetřených souborů vzorků borovice lesní 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

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k možnostem objektivní kontroly procesu nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin 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 borových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu potvrzeného původu.

Borovice lesní je v našich podmínkách z hlediska svého hospodářského uplatnění důležitý druh dřeviny, po smrku je druhou plošně nejrozšířenější dřevinou, která významným způsobem ovlivňuje ekonomiku řady lesních majetků všech forem vlastnictví, a tedy i celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-dřevařského sektoru). Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti lesních porostů bude dosaženo současně i vyšší objemové produkce. Ekonomický přínos využití kvalitních reprodukčních zdrojů pro reprodukci porostů borovice lesní byl vyčíslen v roce 2016 (Cvrčková et al. 2017). Vzhledem k současné kalamitní situaci u lesních porostů (poškození suchem, škůdci) byla vstupní data pro výpočet ekonomického přínosu aktualizována.

Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýtí u borových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním borovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu, činí v objemovém vyjádření cca 123,6 $m^3$/ha.

Kalkulace ekonomického přínosu byla u borovice 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 jehličnatého dříví (pilařská kulatina 60,5 %, vláknina a ostatní průmyslové dříví 27,5 % a palivového dříví 12 %) a při ceně surového dříví za 2. čtvrtletí 2022 ve výši 2123 Kč/m$^3$ za pilařskou kulatinu III. tř. jakosti A/B, 1142 Kč/m$^3$ za dříví V. tř. jakosti pro výrobu buničiny a 1001 Kč/m$^3$ za palivové dříví činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších borových porostů v GZ v době obmýtní částku 212 419 Kč/ha. Tento hrubý výnos po odpočtu celkových těžebních nákladů ve výši 53 519 Kč/ha (průměrné celostátní náklady přitom činí 433 Kč/m$^3$) pak představuje zvýšený čistý výnos ve výši 158 900 Kč/ha. Tato částka je tvořena především značným rozdílem v objemu porostních zásob v GZ oproti celostátnímu průměru porostních zásob borových porostů. Vypočtený výsledný ekonomický efekt (zvýšený čistý výnos) ze smýceného lesního porostu v době obmýtní 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 60 %, a při současném použití těžebních nákladů v místě a čase obvyklých, odpovídajících nižším nákladům vztaženým jen k těžbě mýtně zralých jehličnatých 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 obmýtní, 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 dodatečné ekonomické efekty vyplývající z lepších kvalitativních parametrů budoucích porostů, které by se projevily 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 jehličnatého dříví za období 2012–2021, tabulka č. 2.12, Český statistický úřad, Praha, 2022

- Indexy cen v lesnictví (surové dříví) – 2. čtvrtletí 2022, průměrné ceny surového dříví pro tuzemsko za ČR v roce 2022 (Kč/m$^3$), tabulka 4 – 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 7 lokusů přibližně 190,- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v 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 je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1810129.

# VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY


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.

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.

Dering M., Baranowska M., Beridze B., Chybicki I. J., Danelia 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.

Dzialuk A., Burczyk J. 2004. PCR-Multiplex of six chloroplast microsatellites for population studies and genetic typing in *Pinus sylvestris*. Silvae Genetica, 53: 246–248.

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(4): 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.

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 (12 pp.)

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.

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(14): 1801–1806.

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. Kontroly dodavatelů RM prováděné ze strany ÚHÚL. Lesnická práce, 10: 26–27.

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.

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

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.

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.

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

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.

Şofletea 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.

Šindelář J. 2000. Možné důsledky porušování zákona o lesích a dalších normativních ustanovení při nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin. Zprávy lesnického výzkumu, 3: 37–41.

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.

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.

# VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE


Cvrčková H., Máchová P., Poláková L., Trčková O. 2017. Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 43 s.

Máchová P., Cvrčková H., Poláková L., Trčková O. 2016. Genetická variabilita vybraných populací borovice lesní v České republice. Zprávy lesnického výzkumu, 61: 223–229.

Máchová P., Cvrčková H., Trčková O. 2021.Využití DNA markerů pro kontrolu deklarovaného původu reprodukčního materiálu smrku ztepilého Zprávy lesnického výzkumu, 69: 292–301.

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: 388–390.

Máchová P., Cvrčková H., Trčková O. 2022. Využití DNA markerů pro kontrolu deklarovaného původu reprodukčního materiálu borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.). Zprávy lesnického výzkumu 67: 259–298.

# METHODOLOGY OF USING DNA MARKERS FOR THE SYSTEM OF CONTROL OF DECLARED ORIGIN OF REPRODUCTIVE MATERIAL OF SCOTS PINE


## *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 basis 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 Scots pine 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 identity of reproductive material were carried out during four years, i.e. from the seeds onto transplanted plants production. DNA analyses were performed on 2390 samples of plant material from 10 selected sources of reproductive material. Sampling of reference samples was done from the sets and units of reproductive material listed in Table 2. 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. 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. Seven polymorphic markers (psyl17, psyl42, psyl57,

SPAG 7.14, SPAC 11.4, SPAC 12.5, PtTX3107) with sufficient informative values were selected for the evaluation of the genetic structure of the monitored sets of Scots pine 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 genetic diversity parameters with the primer sequences of the studied markers are reported in Table 1. Nei's genetic distances among Scots pine sample sets, constructed on the basis of principal coordinate analysis (PCoA), are shown in Fig, 1, 2 and 3. 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. 4, 5 and 6). 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. 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 Scots pine 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

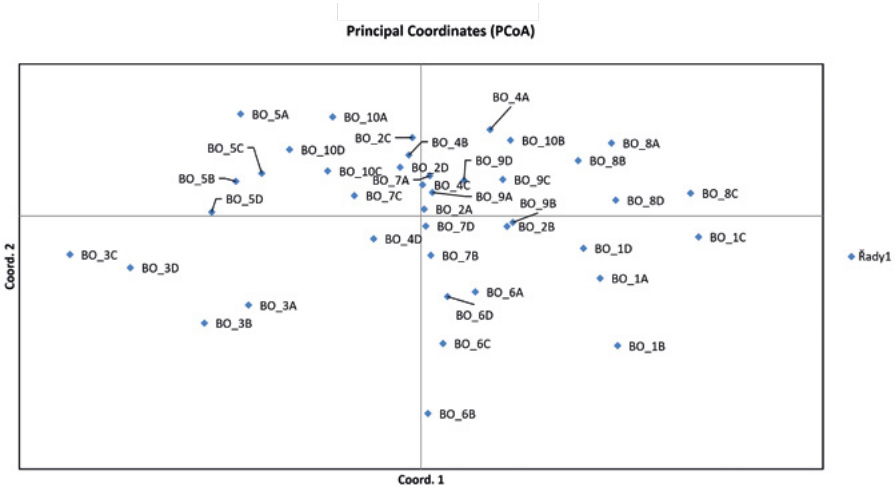
## Příklady výstupů genetických analýz pro nastavení systému kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu u borovice lesní

**Tab. 2:** 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 reproductive material source | Původ/Origin | | | | Fáze odběru vzorku/Sampling phase | Označení souboru vzorků/Designation of sample set |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ČUJ/Source of forest reproductive material | 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/seeds | BO_1A |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | BO_1B |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | BO_1C |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | BO_1D |
| 2 | CZ-2-2B-BO-04715-10-3-S | 2014 | 3. LVS | 10 – Středočeská pahorkatina | osivo/seeds | BO_2A |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | BO_2B |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | BO_2C |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | BO_2D |
| 3 | CZ-3-3-BO-00157-16-6-E | 2015 | 6. LVS | 16 – Českomoravská vrchovina | osivo/seeds | BO_3A |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | BO_3B |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | BO_3C |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | BO_3D |
| 4 | CZ-3-3-BO-00082-15-3-C | 2015 | 3. LVS | 15 – Jihočeské pánve | osivo/seeds | BO_4A |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | BO_4B |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | BO_4C |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted planst | BO_4D |

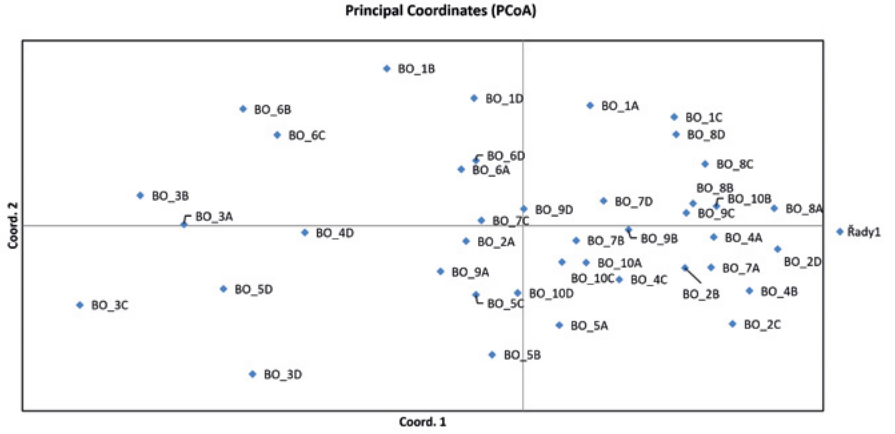
**Tab. 2:** *Pokračování* – Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků borovice lesní
*Continuation* – Overview of forest reproductive material sources and designation of *Scots pine* sample sets

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **5** | **CZ-3-3-BO-00154-29-4-T** | 2018 | 4. LVS | 29 – Nízký Jeseník | osivo/seeds | **BO_5A** |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | **BO_5B** |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | **BO_5C** |
| | | | | | školkované 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/seeds | **BO_6A** |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | **BO_6B** |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | **BO_6C** |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | **BO_6D** |
| **7** | **CZ-3-3-BO-00078-17-2-H** | 2014 | 2. LVS | 17 – Polabí | osivo/seeds | **BO_7A** |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | **BO_7B** |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | **BO_7C** |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | **BO_7D** |
| **8** | **CZ-3-3-BO-00106-1-5-K** | 2017 | 5. LVS | 1 – Krušné hory | osivo/seeds | **BO_8A** |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | **BO_8B** |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | **BO_8C** |
| | | | | | školkované 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/seeds | **BO_9A** |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | **BO_9B** |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | **BO_9C** |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | **BO_9D** |
| **10** | **CZ-3-3-BO-00079-6-2-P** | 2017 | 2. LVS | 6 – Západočeská pahorkatina | osivo/seeds | **BO_10A** |
| | | | | | osivo po zpracování/seed after processing | **BO_10B** |
| | | | | | semenáčky ve školce/nursery seedlings | **BO_10C** |
| | | | | | školkované sazenice ve školce/nursery transplanted plants | **BO_10D** |



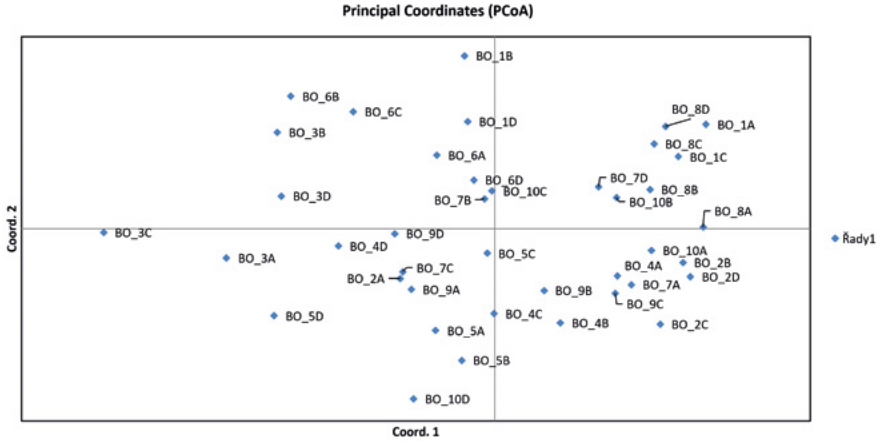

**Obr. 1:** Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 60 vzorků ve sledovaných souborech

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



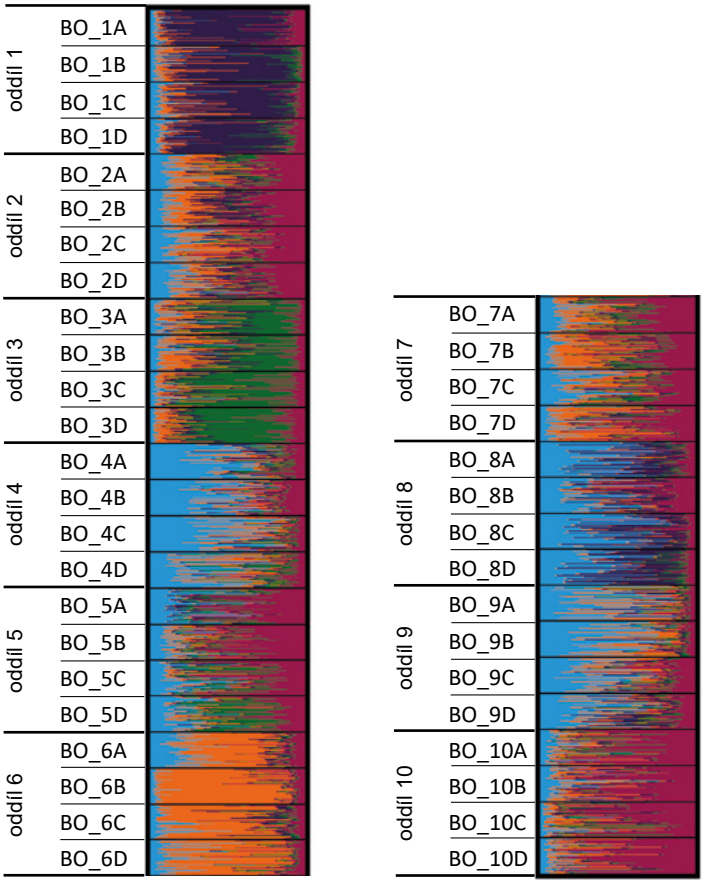

**Obr. 2:** Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 30 vzorků ve sledovaných souborech

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



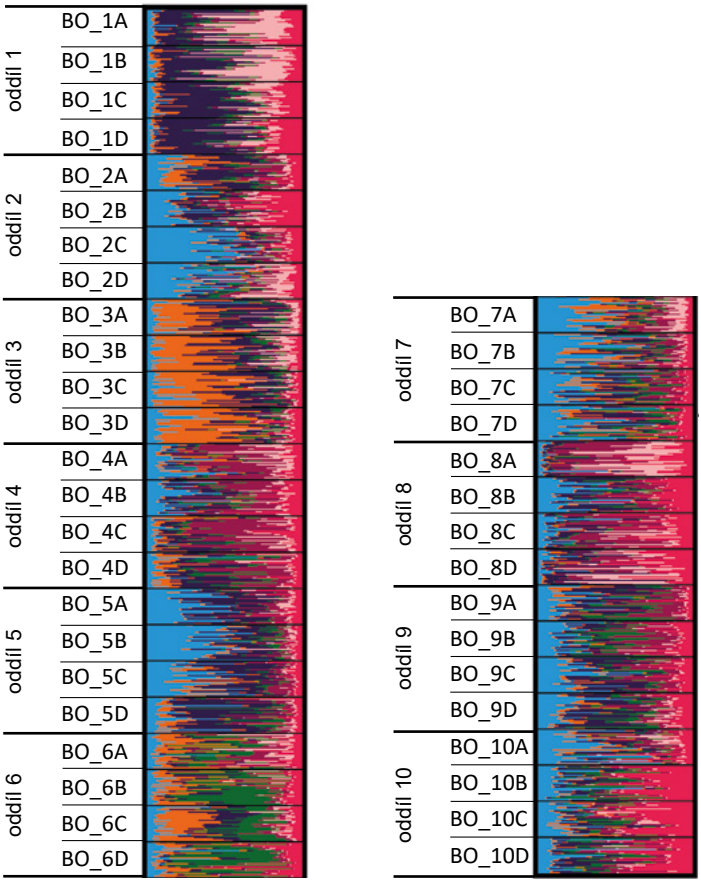

**Obr. 3:** Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 20 vzorků ve sledovaných souborech

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



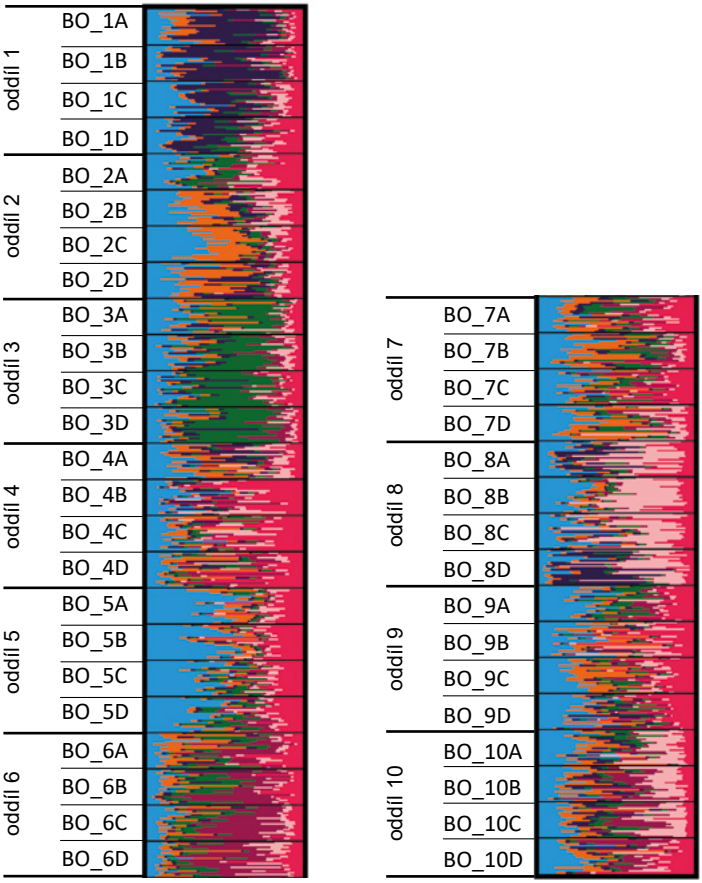

**Obr. 4:** Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro K = 5 u 40 sledovaných souborů vzorků (počet vzorků v souboru 60) z 10 různých zdrojů RM

**Fig. 4:** Evaluation of genetic structure by Bayesian method for K = 5 in 40 observed sets of 60 samples from 10 different sources RM




**Obr. 5:** Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro K = 7 u 40 sledovaných souborů vzorků (počet vzorků v souboru 30) z 10 různých zdrojů RM

**Fig. 5:** Evaluation of genetic 5structure by Bayesian method for K = 7 in 40 observed sets of 30 samples from 10 different sources RM




**Obr. 6:** Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro K = 7 u 40 sledovaných souborů vzorků (počet vzorků v souboru 20) z 10 různých zdrojů RM

**Fig. 6:** Evaluation of genetic structure by Bayesian method for K =7 in 40 observed sets of 20 samples from 10 different sources RM

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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 9/2022