

STANOVENÍ GENETICKÉ DIVERZITY U JEDLE BĚLOKORÉ (*ABIES ALBA* MILL.) NA ZÁKLADĚ MOLEKULÁRNÍCH ANALÝZ



Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
a kol.

4/2023

**Stanovení genetické diverzity
u jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.)
na základě molekulárních analýz**

Certifikovaná metodika

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Bc. Kateřina Vítová

Lesnický průvodce 4/2023

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 978-80-7417-257-1

ISSN 0862-7657

GENETIC CHARACTERIZATION OF SILVER FIR USING MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers (the simple sequence repeats-SSR) method to determine values of genetic diversity such as number of different alleles, heterozygosity, Shannon's information index and inbreeding coefficient for silver fir. 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 level of genetic diversity is currently important for assessing the vitality of the forest populations and their survival in the period of climate change.

Key words: silver fir; DNA analysis; microsatellite markers; genetic diversity; sources of reproduction material; potential of adaptability

Oponenti: Ing. Alžběta Pařízková, ÚHÚL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové
RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant, České Budějovice

Adresy autorů:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Olga Trčková

Bc. Kateřina Vítová

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

Obsah:

I	CÍL METODIKY	7
II	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1	ÚVOD	7
2	METODICKÉ POSTUPY	9
a	Odběr vzorků a postupy izolace DNA	9
b	Postupy PCR amplifikace	12
c	Postupy elektroforézy v agarózovém gelu	19
d	Postupy fragmentační analýzy	
a	hodnocení PCR produktů	20
e	Zpracování molekulárních dat	21
III	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	22
IV	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	23
V	EKONOMICKÉ ASPEKTY	24
VI	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	26
VII	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY	
	METODICE	29
VIII	DEDIKACE	31
	Summary	32
	Příloha	34

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)

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je představit postupy využívající DNA markery pro zjišťování úrovně genetické diverzity mezi jedinci jedle bělokore pro posouzení možných adaptačních schopností porostů. Na základě těchto zjištění je pak možno rozhodnout, zda by porosty byly vhodné k uznání za zdroj reprodukčního materiálu. Při vyšší biologické rozmanitosti porostů lze očekávat vyšší odolnost lesů k nepříznivým podmínkám prostředí pro zachování ekologické stability lesních ekosystémů a pro plnění produkčních i mimoprodukčních funkcí lesa. Porosty s vyšší úrovní diverzity jsou potřebné pro zachování a udržitelné využívání lesních genetických zdrojů. Pro sledování úrovně genetické diverzity byly vypracovány metodické postupy DNA analýz u 17 jaderných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR).

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

V posledním desetiletí vlivem prohlubujících se následků klimatických změn, prudkých výkyvů počasí a nedostatku půdní vláhy dochází k rozsáhlým rozpadům lesních ekosystémů a úbytku hospodářských lesů, především smrkových monokultur. K zachování ekologické stability krajiny a lesních ekosystémů se vyhledávají a ověřují alternativní druhy dřevin, které by měly vyšší potenciál lépe se vyrovnávat s klimaticky náročnými podmínkami, zvyšovat diverzitu lesů a zajistit produkci dřeva. Tyto dřeviny byly v minulosti většinou opomíjeny zejména z ekonomických důvodů a jejich porosty byly značně zredukovány nebo vymýceny s tím, že už nebyly zařazeny do plánované obnovy lesa. U některých druhů docházelo k jejich úbytku i vlivem industriální činnosti člověka a nepříznivou přeměnou stanovištních podmínek. Takovým druhem byla i jedle bělokora (*Abies alba* Mill.) z čeledi borovicovitých (*Pinaceae*), u které především během druhé poloviny 20. století došlo

ke katastrofickému poklesu výskytu vlivem monokulturního způsobu hospodaření s preferencí smrku a borovice i v důsledku znečištěného ovzduší (ŠINDELÁŘ et al. 2001). Po podstatném snížení emisí přibližně od počátku 21. století byla u jedle bělokoré zaznamenána regenerace, která se projevila v celé střední Evropě. Jedle vykazující z domácích dřevin nejvyšší hodnoty objemové produkce má významný potenciál posílit produkci dřeva (NOVÁK, DUŠEK 2021). V lesním ekosystému představuje významný stabilizující prvek pro její pevné zakotvení v půdě výrazným křovím kořenem a hluboko sahajícími postranními kořeny. V Čechách se vyskytuje v pohořích, místy sestupuje do oblasti pahorkatin, ale málokdy překročí výšku nad 1 100 m n. m. (ÚRADNÍČEK et al. 2009). V nižších polohách se nachází ve společnosti buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) a ve středních a vyšších roste ve směsích se smrkem ztepilým (LIEPELT et al. 2009). U smrku ztepilého v současnosti došlo k velkoplošnému rozpadu lesních porostů vzhledem ke klimatickým změnám a následnému přemnožení lýkožrouta smrkového. Poškození biotickými činiteli byla však již zaznamenána i na dalších hospodářsky významných druzích lesních dřevin jako je borovice lesní, buk lesní i jedle bělokorá. Pro zajištění lesních kultur se v současné době klade důraz na dostatečnou druhovou i věkovou pestrost. Nejúčinnější obranou proti nepříznivým vlivům abiotického i biotického charakteru je přirozená odolnost organismů. Ta je podmíněna reakcí stresotolerantních genů, jejichž dostatečné zastoupení lze předpokládat u lesních porostů s vyšší genetickou variabilitou v rámci druhu. Genetická rozmanitost a biodiverzita populací lesních dřevin souvisí s adaptační schopností lesních porostů pro přizpůsobení se změnám klimatu (HAMPE, PETIT 2005; NEALE, KREMER 2011). Proto je velmi důležité geneticky prověřovat potenciální zdroje reprodukčního materiálu. Poznatky o diverzitě porostů mohou přispět k záchraně genových zdrojů lesních dřevin a udržení dlouhodobě stabilních lesních ekosystémů (WHITHAM et al. 2006; NOWAKOWSKA et al. 2014). Genetické výzkumy mitochondriálních, chloroplastových a mikrosatelitových DNA markerů u jedle bělokoré započaly již koncem minulého století (KONNERT, BERGMANN 1995; VENDRAMIN et al. 1999; PARDUCCI et al. 2001; SAGNARD et al. 2002; HANSEN et al. 2005; CREMER et al. 2006, 2012; LIEPELT et al. 2009; PIOVANI et al. 2010; GÖMÖRY et al. 2012; POSTOLACHE et al. 2014; KEMPF et al. 2020; LITKOWIEC et al. 2021; SCOTTI-SAINTAGNE et al. 2021). Pro studium genetické diverzity lesních dřevin se osvědčily především jaderné mikrosatelitové markery - nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery, které jsou zpravidla složené z opakujících se krátkých motivů nukleotidů a patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu, kdy je polymorfismus dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu nukleotidů (OLIVEIRA et al. 2006). Kodominantní charakter těchto markerů umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů pro zhodnocení diverzity a příbuznosti.

Účelem představených metodických postupů je na základě vhodně zvolených a ověřených mikrosatelitových markerů zjišťovat mezi jedinci zkoumaných porostů jedle bělokoré úroveň genetické diverzity. Podle výše získaných hladin genetické diverzity je možné odvozovat adaptační schopnosti porostu a z něho namnoženého potomstva. U jedle bělokoré je znalost genetické struktury důležitá z důvodu v minulosti silné redukce jejího výskytu, a tím možného zúžení jejího genofonu. Vytvářet variabilní odolné jedlové porosty je důležité z hlediska možných kalamitních poškození v příštím období v důsledku zhoršujících se podmínek prostředí a plánovaného navýšení zastoupení jedle v lesním hospodářství pro možnou náhradu za smrk ztepilý. Pro lesnické účely je potřebné u donorových jedinců z porostů navrhovaných na uznání za zdroje reprodukčního materiálu charakterizovat úroveň jejich genetické variability pomocí vhodných DNA markerů. Znalost stromů vykazujících dostatečné genetické odlišnosti je podstatná pro zachování variabilního genofonu jedle bělokoré a měla by být využita pro její reprodukci.

Metodické postupy představují odběry vzorků, jejich zpracování, izolace DNA, amplifikace mikrosatelitových lokusů, fragmentační analýzy a vyvození genetických charakteristik po statistickém zhodnocení zjištěných velikostí alel příslušných markerů.

2 Metodické postupy

a Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

Zahradní nůžky, teleskopické nůžky, přenosné chladničky (chladicí boxy), mikrotenové sáčky na vzorky, popisky, lyofilizátor, vzduchotěsné zkumavky, analytické váhy, souprava izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladicí blok na mikrozkušavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, třecí misky s tloučky, sada pipet a příslušné sterilní špičky, sterilní mikrozkušavky Eppendorf 1,5ml s víčky, sušička nebo sterilizátor.

Nejvhodnějším rostlinným materiálem pro získání kvalitních eluátů DNA jsou pupeny nebo mladé jehlice odebírané v jarním období nebo na počátku léta. Izolace ze starších jehlic z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů nepo-

skytuje dostatečně kvalitní DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR zaměřené na získání kvalitních amplifikovaných lokusů. Pro zpracování většího počtu vzorků je výhodnější odebírat mladé jehlice, zpracování pupenů je časově náročnější. Odebírá se malé množství rostlinného materiálu, na izolaci dle popsaných metodických postupů postačuje 100 mg čerstvého materiálu nebo 20 mg lyofilizovaného. Při odběru je důležité pečlivé značení vzorků a jejich evidence, aby při následné manipulaci nedošlo k záměně mezi vzorky. Označené vzorky se uloží do mikroténového sáčku a udržují při nízké teplotě přibližně 4 °C (např. lze použít chladové tašky s namraženými destičkami), abychom zabránili degradaci DNA. Ideální je vzorky co nejrychleji přepravit ke zpracování do laboratoře. DNA je nutné po převozu okamžitě izolovat nebo odebrané vzorky uložit do mrazničky a uchovávat při -20 °C. Výhodnou možností pro dlouhodobé uchovávání vzorků je jejich vysušení mrazem s využitím lyofilizátoru, kdy lze lyofilizovaný vzduchotěsně uzavřený materiál skladovat již při pokojové teplotě. Pro izolaci DNA z lesních dřevin se na našem pracovišti nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Touto metodou lze v krátkém časovém úseku získat kvalitní eluáty DNA. Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá etanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. V případě výskytu sraženin v pufrech AP1 a AW1 se roztoky nahřejí. Inkubační lázeň se nechá nahřívat na 65 °C, aby byla připravena pro 2. krok pracovního postupu.

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 RNázy A. 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, poté se směs centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 rpm .
4. Vzniklý lysát 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 pomocí mikropipety vzniklou směs promícháme.
7. Odpipetujeme 650 μ l směsi a přemístíme ji do DNeasy Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube). 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 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 8 000 rpm. Získáme 100 μ l prvního eluátu.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu. Vzorky DNA skladujeme při -20 °C, pro dlouhodobé uchování při -80. °C

Kvalita eluátů DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. U izolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/ μ l a čistotu na základě poměru absorbancí UV záření o vlnové délce 260 nm a 280 nm s využitím spektrofotometru na mikroobjemy. Hodnoty tohoto poměru by se pro optimální čistotu 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/ μ l je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrem.

b Postupy PCR amplifikace

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda jaderných mikrosatelitů – nuclear simple sequence repeats (nSSR). Mikrosatelity se skládají z opakujících se krátkých nukleotidových motivů složených nejčastěji ze 2–4 nukleotidových bází. Organismy se mezi sebou často liší svým počtem, tedy délkou mikrosatelitových lokusů. Pro vyhodnocení jejich délky, která se u většiny markerů pohybuje mezi 100–300 bázemi, je nutné specifické úseky v rámci celého genomu rozpoznat, což se děje jejich namnožením v mnohonásobné kopie pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). K PCR amplifikaci jsou nezbytné primery (krátké oligonukleotidy většinou dlouhé kolem 20 bází), které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem, enzym polymeráza řídící proces amplifikace, stavební jednotky nukleotidy a pufrý upravující prostředí probíhající reakce. PCR reakce probíhají v teplotních cyklech za účelem rozdělení DNA dvoušroubovic na jednotlivá vlákna (denaturace při teplotě kolem 94 °C), nasazení primerů na specifická místa (annealing, většinou mezi 50–60 °C) a tvorbu nových cílených dvouřetězových úseků (elongace, nejčastěji při 72 °C). Opakováním těchto cyklů exponenciálně přibývají kopie specifického úseku DNA – mikrosatelitového lokusu. Postupy PCR (koncentrace reakčních složek, teploty a časy cyklů) je nutné optimalizovat, abychom získávali jednoznačné a reprodukovatelné PCR produkty. Pro DNA analýzy u jedle bělokoré bylo laboratorně ověřeno 17 mikrosatelitových markerů. Sekvence příslušných primerů (Tab. 1) byly čerpány pro NFH3, NFF3, NFH15, NFF7 z publikace HANSEN et al. (2005), pro SF b4, SFb5, SF g6, SF 78, SF 1 z publikace CREMER et al. (2006) a pro Aat01, Aat04, Aat07, Aat10, Aat12, Aat14, Aag01, Aag02 z publikace POSTOLACHE et al. (2014). Pro získání kvalitních amplifikátů byly pro tyto markery optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány protokoly. Z úsporných důvodů je výhodné provádět PCR amplifikace několika markerů zároveň v multiplexech. U vybraných 17 lokusů lze na základě velikosti amplifikátů a použitých reakčních podmínek provést PCR amplifikace ve 3 multiplexech (1. multiplex s lokusy SFb4, NFH3, NFF3, SFg6, Aag02, SFb5, 2. multiplex s lokusy SF78, SF1, NFH15, NFF7, Aat01, Aag01, 3. multiplex s lokusy Aat04, Aat07, Aat10, Aat12, Aat14). Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce. DNA polymeráza se musí stále uchovávat při -20 °C, přidáváme ji proto do směsi jako poslední složku a manipulaci s ní zkrátíme na nezbytnou dobu.

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokusy	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
SFb4	F: GCCTTTGCAACATAATTGG R: TCACAATTGTTATGTGTGTGG	149–191
NFH3	F: TTGCCATCAAATTA AAAATGCTT R: CATCATTCTCTCTATCCCCATCA	95–137
NFF3	F: CCAATGGGTTGTCAGAGTGTT R: GGCATTGAGATTGCTTGAT	115–137
SFg6	F: GTAACAATAAAAGGAAGCTACG R: TGTGACACATTGGACACC	100–118
Aag02	F: TATTCCTCCACTTGGGTGCT R: GGTGGAGATCCGTATGCAAT	205–233
SFb5	F: AAAAAGCATCACTTTTCTCG R: AAGAGGAGGGGAGTTACAAG	131–153
SF78	F: CATTGTTGTCTTTGTTTCACA R: TGCACCGTTTTGTTTTCC	154–262
SF1	F: TTGACGTGATTAACAATCCA R: AAGAACGACACCATCTCAC	183–222
NFH15	F: CGCCTCCCTCCATTACTTC R: TCGTCTAGAGAGGCCAAATTCT	100–126
NFF7	F: CCCAACTGGAAGATTGGAC R: ATCGCCATCCATCATCAGA	123–159
Aat01	F: CCATGTCTCCGATTTCCAGT R: GGCCTAACGAAAGCAGAATC	105–117
Aag01	F: GCTTATTCTCACTGCTCGCC R: ATGACTTGAAGGTGGATGCC	191–221
Aat04	F: CCATGTATGGTGCTCCTCCT R: CCTTCATTGCAGAAAAGCAA	155–167
Aat07	F: GCTAGCAGAACCCTGGAATG R: GGTGGGATATTCCAGCAAG	218–236
Aat10	F: GAGCACGATGAAGAGGAAGC R: AAAACCCCCACGCGGTAT	225–239
Aat12	F: ATCCATATCTCCTGCCTTGC R: CTTTCCAGGTGATCTGATTGC	302–328
Aat14	F: GACTGGGGATCCTGCTGTTA R: AGAGGAGGCAGCCCATACAT	363–381

Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

Vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkušavky (stripy, destičky PCR 0,2ml s víčkem), chladicí box na PCR mikrozkušavky, fluorescenčně označené primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5' konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET), chemikálie k přípravě TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA), polymeráza Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Life Technologies), kit Type-it® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany), H₂O (molecular biology reagent, Sigma – Aldrich), chladicí destička, centrifuga, teplotní cyklovač pro PCR.

Multiplex 1 – SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení na 5' konci forward primerů 6FAM (modrá), NED (žlutá), VIC (zelená), PET (červená):

SFb4 F – 6 μM (6FAM), SFb4 R – 6 μM

SFb5 F – 2 μM (PET), SFb5 R – 2 μM

NFH3 F – 2 μM (NED), NFH3 R – 2 μM

NFF3 F – 1 μM (VIC), NFF3 R – 1 μM

SFg6 F – 6 μM (6FAM), SFg6 R – 6 μM

Aag02 F – 2 μM (PET), Aag02 R – 2 μM

Primery (forward i revers) naředíme na zásobní roztoky 100 μM 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 zásobních 100 μM roztoků primerů: SFb4 F – 6 μl, SFb4 R – 6 μl, SFb5 F – 2 μl, SFb5 R – 2 μl, NFH3F – 2 μl, NFH3R – 2 μl, NFF3 F – 1 μl, NFF3 R – 1 μl, SFg6 F – 6 μl, SFg6 R – 6 μl, Aag02 F – 2 μl, Aag02 R – 2 μl a doplníme 62 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 H₂O (molecular biology reagent, Sigma – Aldrich) do 10 ml.

Optimalizovaný protokol PCR s polymerázou Platinum® Taq DNA Polymerase (In-vitrogen 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 ₂ O (molecular biology reagent, Sigma – Aldrich)	10,775 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(Pozn. reagentie Polymerase Platinum Taq, 10 x PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
35 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	58 °C	30 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Multiplex 2 – SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení na 5'konci forward primerů 6FAM (modrá), NED (žlutá), VIC (zelená), PET (červená):

SF78 F – 2 μ M (VIC), SF78 R – 2 μ M

SF1 F – 3 μ M (NED), SF1 R – 3 μ M

NFH15 F – 2 μ M (NED), NFH15 R – 2 μ M

NFF7 F – 0,5 μ M (6FAM), NFF7 R – 0,5 μ M

Aat01 F – 2 μ M (PET), Aat01 R – 2 μ M

Aag01 F – 2 μ M (PET), Aag01 R – 2 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 zásobních 100 μ M roztoků primerů: SF78 F – 2 μ l, SF78 R – 2 μ l, SF1 F – 3 μ l, SF1 R – 3 μ l, NFH15 F – 2 μ l, NFH15 R – 2 μ l, NFF7 F – 0,5 μ l, NFF7 R – 0,5 μ l, Aat01 F – 2 μ l, Aat01 R – 2 μ l, Aag01 F – 2 μ l, Aag01 R – 2 μ l a doplníme 77 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 x PCR Buffer, minus Mg	1,5 μ l
50 mM MgCl ₂	0,6 μ l
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,3 μ l
Primers mix	0,75 μ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 μ l
H ₂ O (molecular biology reagent, Sigma – Aldrich)	10,775 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

(Pozn. reagentie Polymerase Platinum Taq, 10 $\times$ PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂ jsou dodány výrobcem společně s polymerázou)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
35 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	58 °C	30 sec	Annealing
4.	72 °C	45 sec	Elongace
1x			
5.	72 °C	20 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Multiplex 3 – SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení na 5'konci forward primerů 6FAM (modrá), NED (žlutá), VIC (zelená):

Aat04 F – 1 μ M (6FAM), Aat04 R – 1 μ M

Aat07 F – 2 μ M (NED), Aat07 R – 2 μ M

Aat10 F – 1 μ M (VIC), Aat10 R – 1 μ M

Aat12 F – 2 μ M (6FAM), Aat12 R – 2 μ M

Aat14 F – 2 μ M (NED), Aat14 R – 2 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 zásobních 100 μ M roztoků primerů: Aat04 F – 1 μ l, Aat04 R – 1 μ l, Aat07 F – 2 μ l, Aat07 R – 2 μ l, Aat10 F – 1 μ l, Aat10 R – 1 μ l, Aat12 F – 2 μ l, Aat12 R – 2 μ l, Aat14 F – 2 μ l, Aat14 R – 2 μ l a doplníme 84 μ l TE pufru).

Optimalizovaný protokol pro PCR reakce v celkovém objemu 15 µl na 1 vzorek s využitím Type-it® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
H ₂ O RNase – free	4,25 µl
Qiagen Multiplex	7,5 µl
Primers Mix	0,75 µl
Q-solution, 5x	1,5 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	5 min	Počáteční denaturace
32 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	95 °C	30 sec	Denaturace
3.	58 °C	90 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1x			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Uvedené chemikálie kromě primerů jsou součástí komerčního kitu Type-it® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

c Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

Analytické váhy, sada pipet a sterilní špičky, agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg), $0,5 \times$ TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.), mikrovlnná trouba, vortex, GelRed (GelRedTMNucleic acid Gel Stain, 10,000XinWater, Biotium, Hayward), gel loading buffer (Sigma-Aldrich), 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), ultra čistá voda, horizontální elektroforéza se zdrojem, fluorescenční dokumentační systém gelů.

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 (GelRedTMNucleic acid Gel Stain, 10,000XinWater, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1 : 10 000 a po promíchání se gel naleje do formy. Do tekutého gelu se ihned vloží hřebínky s vhodným počtem hrotů dle počtu testovaných vzorků. Ztuhlý gel se opatrně přemísť 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 pipetují PCR amplifikáty (15 μ l) smíchané se 4 μ l pufru (gel loading buffer, Sigma-Aldrich). Pro porovnání 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 zpočátku 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. Příklad elektroforetického záznamu amplifikačních produktů testovaného markeru Aat12 je uveden v příloze (obr. 1).

d Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

Sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, formamid (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem), velikostní standard (Gene Scan™ – 600 LIZ® Size standard v 2.0, Applied Biosystem), vortex, 96jamkové destičky určené pro analyzátory, teplotní cyklovač, centrifuga, genetický analyzátor.

Zjištění přesné velikosti 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 (např. MicroAmp 96 Well Reaction Plate od ABI Applied Biosystem), 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 se roztok stáhl ke dnu 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 fragmenty DNA zkoumaného vzorku jsou do kapiláry naplňovány automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserovým zářením. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, a to umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů, což je z časových i finančních důvodů velmi výhodné. Pro správnou identifikaci analyzovaných lokusů je nutné jejich kombinaci sestavit s ohledem na velikosti alel a fluorescenčního zabarvení primerů.

U amplifikátů 17 mikrosatelitových lokusů probíhají fragmentační analýzy ve třech bězích. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (SFb4, NFH3, NFF3, SFg6, Aag02, SFb5), v druhém běhu probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (SF78, SF1, NFH15, NFF7, Aat01, Aag01) a ve třetím běhu multiplexu 3 (Aat04, Aat07, Aat10, Aat12, Aat14). Po provedené denaturaci se destička vkládá do genetického analyzátoru. Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru pro jedince jedle bělokoré je uvedena v příloze (obr. 2).

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.

e Zpracování molekulárních dat

Jaderné mikrosatelitové markery jsou specifické úseky DNA s kodominantním charakterem. Jedle bělokorá má diploidní sadu chromozómů ($2n$), a to znamená, že u sledovaného lokusu získáme fragmentační analýzou pro každého jedince dvě shodné velikosti alel v případě homozygota a v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Velikosti alel ze 17 mikrosatelitových markerů šetřených jedinců jedle bělokoré (zpracovaná multilokusová genotypizace) podrobíme statistickým analýzám, např. za využití statistických programů GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENEPOP 4.2 (RAYMOND, ROUSSET 1995; ROUSSET 2008), STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009) pro získání genetických charakteristik u sledovaných stromů a markerů. Pro kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

Na základě získaných hodnot genetických charakteristik lze hodnotit úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, Shannonův informační index, genetické diferenciace, hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur apod. Ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi (porosty) lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972). Představené metodické postupy vedoucí k získání velikostí alel u uvedených mikrosatelitových markerů pro jednotlivé stromy jedle bělokoré lze využít i pro ověřování klonové identity např. v semenných sadech.

Zhodnotit genetickou příbuznost mezi jedinci v rámci jednoho porostu navrhovaného k uznání za zdroj reprodukčního materiálu lze s využitím statistického programu (např. GenAlEx 6.5) párovým porovnáním získaných multilokusových genotypů u šetřených stromů.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost představených metodických postupů spočívá ve využití širšího spektra odzkoušených polymorfních jaderných mikrosatelitových markerů (NFH3, NFF3, NFH15, NFF7, SFb4, SFb5, SFg6, SF78, SF1, Aat01, Aat04, Aat07, Aat10, Aat12, Aat14, Aag01, Aag02) pro ověřování genetické příbuznosti jedinců jedle bělokoré u vybraných porostů navrhovaných k uznání za zdroje reprodukčního materiálu v České republice (ČR) a získání dalších genetických charakteristik hodnotících úroveň genetické diverzity. Získání dostatečně geneticky variabilního potomstva je podstatné pro adaptační schopnost budoucích porostů v měnících se podmínkách životního prostředí (SMULDERS et al. 2008). Optimalizované postupy DNA analýz 17 uvedených mikrosatelitových markerů se získáním přesných velikostí alel na genetickém analyzátoru jsou v metodice podrobně uvedeny. Postupy analýz byly optimalizovány i za účelem jejich seskupení do tří multiplexů pro snížení finančních nákladů a úspore času. Po statistickém zpracování multilokusových dat lze získané informace o genetických charakteristikách využít jako podkladový materiál pro výběr vhodných zdrojů reprodukčního materiálu. Výběr SSR markerů vykazujících polymorfismus byl uskutečněn na základě provedených analýz souborů vzorků z vybraných jedlových porostů.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodické postupy stanovení úrovně genetické diverzity u jedle bělokoré na základě molekulárních analýz jsou podstatné pro získávání přehledu o genetické proměnlivosti porostů jedle na území ČR a budou sloužit pro potřeby státní správy v oblasti lesního a vodního hospodářství (MZe, MŽP). Uplatnění získaných znalostí o geneticky podmíněné proměnlivosti se předpokládá např. při aktualizaci souvisejících legislativních předpisů v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem a jako podkladů pro aktualizace Oblastních plánů rozvoje lesa. Informace o úrovni genetické diverzity jsou významné i pro vlastníky lesů a zdrojů reprodukčního materiálu. Zajištění ověřování identity ramet a jejich příslušnosti k ortetům u nově zakládaných semenných sadů na objektivním podkladě DNA analýz je využíváno pro potřeby koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (ÚHÚL) i za účelem aplikace dotační politiky u vlastníků zdrojů reprodukčního materiálu. Zpracované metodické postupy analýz většího spektra SSR markerů bude možné využít nejen pro přesnější klonovou identifikaci jedinců, ale mohou být uplatněny např. při přípravě metodických postupů DNA analýz využitelných pro doplnění systému kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu jedle bělokoré.

Genetická rozmanitost populací je podstatná pro přežití jejich zástupců a přizpůsobení se změnám životních podmínek na stanovišti. Proto prognóza dalšího vývoje populací a jejich zachování je uskutečnitelná především na základě zjištění genetické struktury. Znalost úrovně genetické diverzity, diferenciací, heterozygotnosti a ostatních genetických charakteristik populací, které se využívají nebo plánují využívat jako zdroj reprodukčního materiálu, je významná k efektivnějšímu využívání stávajících genetických zdrojů pro zkvalitňování genetické struktury populací a k zachování biodiverzity. Povinnost zachovávat a reprodukovat genetické zdroje lesních dřevin vyplývá mimo jiné z mezinárodních závazků ČR, přijetí Úmluvy o biologické rozmanitosti dne 5. června 1992 v Rio de Janeiro a naplnění závěrů ministerských konferencí o ochraně lesů Forest Europe (Štrasburk 1990, Helsinky 1993, Lisabon 1998, Vídeň 2003, Varšava 2007, Oslo 2011, Madrid 2015 a Bratislava 2021). Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí ČR, Strategie ochrany biologické rozmanitosti ČR 2016–2025, Státní program ochrany přírody a krajiny České republiky pro období 2020–2025.

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Za významný ekonomický aspekt vypracovaných metodických postupů DNA analýz u jedle bělokoré lze považovat celospolečenský přínos. Poznatky o genetické diverzitě porostů jsou nezbytné při řešení aktuálních problémů týkajících se zachování lesních ekosystémů v období nepříznivých změn klimatu. Zachování a reprodukce geneticky rozmanitějších, a tím odolnějších lesních porostů významně přispívá i k plnění produkčních a mimoprodukčních funkcí lesa. Jedle bělokorá svými biologickými vlastnostmi představuje v lesích významný stabilizující a meliorační prvek. Vymizení jedle bělokoré kořenící až do 1,5-2 m způsobilo ztrátu hlubšího prokořenění půdy a změnu půdního klimatu. S poklesem půdní jakosti došlo ke zhoršení podmínek pro obnovu velmi hodnotných porostních směsí. Snížila se odolnost lesů také tím, že ubylo porostů zajištěných proti větru. Dostavil se pokles hmotné produkce, jakou zajišťovala směs jedle, buku a smrku, a tím klesla produktivita ploch našich lesů (SVOBODA 1953). Jedle bělokorá je na území ČR zastoupena pouze na 1,2 % porostní plochy (Zpráva MZe 2021).

Z ekonomických aspektů lesnického hospodaření má rozšíření jedle bělokoré značný potenciál z hlediska zvýšení stability, vitality, diverzity a hospodářské produktivity lesních porostů. Jedle bělokorá vykazuje z domácích dřevin nejvyšší hodnoty objemové produkce (NOVÁK, DUŠEK 2021). U jedlových porostů založených z kvalitních genetických zdrojů se dá reálně předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů, kdy v době mýtní zralosti bude dosaženo vyšší objemové produkce. Rozdíl porostních zásob vztažených k obmýtí u jedlových porostů nacházejících se v genových základnách (GZ) oproti ostatním jedlovým porostům na území ČR, zjištěný na základě analýzy celostátních informací v datovém skladu (PAŘÍZKOVÁ 2016), činí v objemovém vyjádření cca 184 m³/ha a jednoznačně reprezentuje lepší produkční bázi v genových základnách.

Vypracováním metodických postupů k ověřování genetické diverzity současně dochází i k naplňování cílů Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin – podporovat kvalitní genetické zdroje a ověřovat jejich identitu metodou DNA markerů. Reprodukce genově bohatších populací zaručuje získání stabilnějších a odolnějších porostů, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat možným změnám klimatu, a tím přispívat k ochraně životního prostředí.

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 nákla-

dy 129 Kč vč. DPH. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 17 lokusů přibližně 268 Kč vč. DPH za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány dle cen letošního roku. 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. Při využití služeb komerčních laboratoří je možné se obrátit například na společnosti SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV.

Přínosy pro uživatele metodiky budou spočívat ve finanční úspoře vynaložených prostředků na vývoj metodických postupů analýz DNA s využitím 17 mikrosatelitových markerů u jedle bělokoré pro zjišťování úrovně diverzity, například při výběru vhodných diverzních porostů nebo jedinců pro jejich uznání za zdroje reprodukčního materiálu a pro klonovou determinaci u semenných sadů a ve směsích klonů. Uvedené postupy DNA analýz klonové identifikace jsou využitelné pro kontrolní mechanismy u reprodukčních zdrojů. Postupy k ověřování genetické diverzity jsou základem cíleného zvyšování genové variability porostů, které budou stabilnější a odolnější k možným chorobám, škůdcům a nepříznivým podmínkám klimatu. Také lze předpokládat zvýšený ekonomický přínos z těžby dřeva u vlastníků lesů ze zvýšených budoucích výnosů z porostů založených z kvalitních ověřených zdrojů reprodukčního materiálu.

VI SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- CREMER E., LIEPELT S., SEBASTIANI F., BUONAMICI A., MICHALCZYK I. M., ZIEGENHAGEN B., VENDRAMIN G. G. 2006. Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Molecular Ecology Notes*, 6: 374-376.
- CREMER E., ZIEGENHAGEN B., SCHULEROWITZ K., MENGEL CH., DONGES K., BIALOZYT R., HUSSENDÖRFER E., LIEPELT S. 2012. Local seed dispersal in European silver fir (*Abies alba* Mill.): lessons learned from a seed trap experiment. *Trees*, 26: 987-996.
- 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: 574-578.
- GÖMÖRY D., PAULE L., KRAJMEROVÁ D., ROMŠÁKOVÁ I., LONGAUER R. 2012. Admixture of genetic lineages of different glacial origin: a case study of *Abies alba* Mill. in the Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*, 298: 703-712.
- HAMPE A., PETIT R. J. 2005. Conserving biodiversity under climate change: The rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461-467.
- HANSEN O. K., VENDRAMIN G. G., SEBASTIANI F., EDWARDS K. J. 2005. Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, 5: 125-129.
- 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.
- KALINOWSKI S. T., TAPER M. L., MARSHALL T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.
- KEMPF M., ZAREK M., PALUCH J. 2020. The pattern of genetic variation, survival and growth in the *Abies alba* Mill. population within the introgression zone of two refugial lineages in the Carpathians. *Forests*, 11: 849.

- KONNERT M., BERGMANN F. 1995. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, 196: 19-30.
- LIEPELT S., CHEDDADI R., DE BEAULIEU J. L., FADY B., GÖMÖRY D., HUSSENDÖRFER E., KONNERT M., LITT T., LONGAUER R., TERHÜRNE – BERTSON R., ZIEGENHAGEN B. 2009. Postglacial range expansion and its genetic imprints in *Abies alba* Mill. – A synthesis from palaeobotanic and genetic data. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 153: 139-149.
- LITKOWIEC M., SĘKIEWICZ K., ROMO A., OK T., DAGHER-KHARRAT M. B., JASIŃSKA A., SOBIERAJSKA K., BORATYŃSKA K., BORATYŃSKI A. 2021. Biogeography and relationships of the *Abies* taxa from the mediterranean and central Europe regions as revealed by nuclear DNA markers and needle structural characters. *Forest Ecology and Management*, 479: 118606.
- NEALE D. B., KREMER A. 2011. Forest tree genomics: Growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*, 12: 111–122.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- NOVÁK J., DUŠEK D. 2021. Výchova porostů jedle bělokoré – review. *Zprávy lesnického výzkumu*, 66: 176-187.
- 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: 47–54.
- OLIVEIRA E. J., PÁDUA J. G., ZUCCHI M. I., VENCovsky R., VIEIRA M. L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- PARDUCCI L., SZMIDT A. E., MADAGHIELE A., ANZIDEI M., VENDRAMIN G. G. 2001. Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 733-740.
- PAŘÍZKOVÁ A. 2016. Analýza datového skladu ÚHÚL – DS ERMA, Hradec Králové.
- 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. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- PIOVANI P., LEONARDI S., PIOTTI A., MENOZZI P. 2010. Conservation genetics of small relic populations of Silver fir (*Abies alba* Mill.) in northern Apennines. *Plant Biosystem*, 144: 683–691.
- POSTOLACHE D., LEONARDUZZI C., PIOTTI A., SPANU I., ROIG A., FADY B., ROSCHANSKI A., LIEPELT S., VENDRAMIN G. G. 2014. Transcriptome versus genomic microsatellite markers: Highly informative multiplexes for genotyping *Abies alba* Mill. and congeneric species. *Plant Molecular Biology Report*, 32: 750–760.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- ROUSSET F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- SAGNARD F., BARBEROT C., FADY B. 2002. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France. *Forest Ecology and Management*, 157: 175–189.
- SCOTTI-SAINTAGNE C., BOIVIN T., SUEZ M., MUSCH B., SCOTTI I., FADY B. 2021. Signature of mid-Pleistocene lineages in the European silver fir (*Abies alba* Mill.) at its geographic distribution margin. *Ecology and Evolution*, 11: 10984–10999.
- SMULDERS M. J. M., COTTRELL J. E., LEFÈVRE F., VAN DER SCHOOT J., ARENS P., VOSMAN B., TABBENER H. E., GRASSI F. et al. 2008. Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration. *Forest Ecology and Management*, 255: 1388–1399.
- ŠVOBODA P. 1953. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část I. Praha, Státní zemědělské nakladatelství.
- ŠINDELÁŘ J., FRÝDL J. 2001. Nové poznatky o jedli bělokoré. *Lesnická práce*, 80 (5): 209–211.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.

- VAN OOSTERHOUT C., HUTCHINSON W. F., WILLS D. P. M., SHIPLEY P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- VENDRAMIN G. G., DEGEN B., PETIT R. J., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., ZIEGENHAGEN B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology*, 8: 1117–1126.
- WHITHAM T. G., BAILEY J. K., SCHWEITZER J. A., SHUSTER S. M., BANGERT R. K., LEROY C. J., LONSDORF E. V., ALLAN G. J., DiFAZIO S. P., POTTS B. M. et al. 2006. A framework for community and ecosystem genetics from genes to ecosystems. *Nature Reviews Genetics*, 7: 510–523.
- Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České Republiky v roce 2021. Praha, Ministerstvo zemědělství ČR: 124 s.

VII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MALÁ J. 2015. Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity among selected populations of *Abies alba* Mill. in the Czech Republic. *Journal of Forest Science*, 61(8): 345–351.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2015. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Strnady, VÚLHM: 36 s. Lesnický průvodce 8/2015.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2016. Genetická charakterizace jedle bělokore pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 34 s. Lesnický průvodce 5/2016.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2016. Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 35 s. Lesnický průvodce 8/2016.

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O. 2017. Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 43 s. Lesnický průvodce 4/2017.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. 2019. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u lípy srdčité (*Tilia cordata* Mill). Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 36 s. Lesnický průvodce 4/2019.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. 2020. Určování klonově identických jedinců modřínu opadavého (*Larix decidua* Mill.) a sledování jejich diverzity na základě analýz u mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 36 s. Lesnický průvodce 3/2020.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. 2021. Metodické postupy ověřování genetické diverzity a klonové identity u břízy bělokoré (*Betula pendula* Roth) s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 32 s. Lesnický průvodce 4/2021.
- CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L., MÁCHOVÁ P., VÍTOVÁ K. 2022. Metodické postupy charakterizace genetické diverzity u topolu černého (*Populus nigra* L.) s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 22 s. Lesnický průvodce 8/2022.
- 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. Strnady, VÚLHM: 37 s. Lesnický průvodce 13/2021.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., CAFOUREK J., ŠIMERDA L. 2022. Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu borovice lesní. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 39 s. Lesnický průvodce 9/2022.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., CAFOUREK J., ŠIMERDA L. 2022. Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu buku lesního. Certifikovaná metodika. Strnady, VÚLHM: 40 s. Lesnický průvodce 10/2022.

VIII DEDIKACE

Metodika vznikla v rámci podpory na rozvoj výzkumné organizace č. MZE-RO0123 a výzkumného projektu NAZV č. QK22020062.

GENETIC CHARACTERIZATION OF SILVER FIR USING MICROSATELLITE MARKERS

Summary

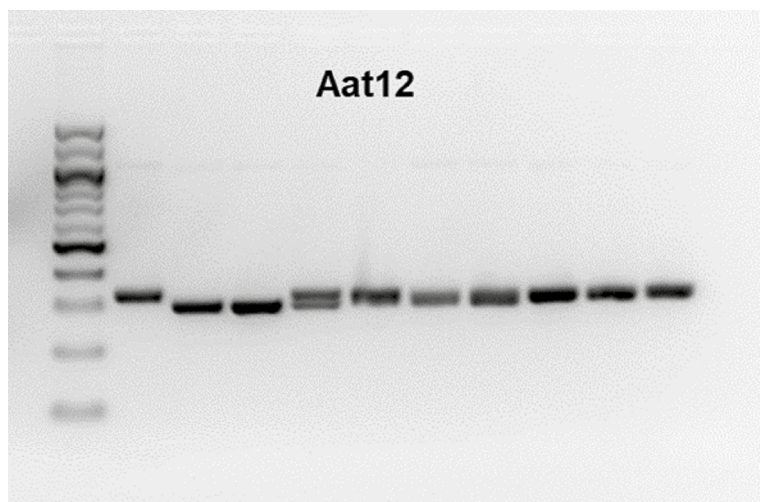
As a result of climate change, there is extensive disintegration of forest ecosystems and the decline of economic forests, especially spruce monocultures. Alternative wood species are being verified, which would have a higher potential to cope better with climatically demanding conditions, increase the diversity of forests and ensure wood production.

Abies alba Mill. a coniferous species belonging to the *Pinaceae* family has a very important ecological role as a stabilizing and meliorating element in the forest ecosystem. It is a native species in the Czech Republic, where it grows in the mountains up to 1,100 m above the sea level. In the past, fir stands were reduced, a catastrophic decline occurred as a consequence of environmental stress factors and silvicultural preferences for other conifers, mostly Norway spruce, especially during second half of the 20th century (ŠINDELÁŘ et al. 2001). Diminishing silver fir brings not only environmental but also economic losses. Silver fir showing the highest values of volume production among domestic tree species has a significant potential to strengthen wood production (NOVÁK, DUŠEK 2021). In order to ensure forest cultures, the emphasis is currently given on sufficient species and age diversity. The most effective defense against adverse effects is the natural resistance of organisms. This is conditioned by the reaction of stress-tolerant genes, the sufficient representation of which can be assumed in forest stands with higher genetic variability. The purpose of the presented methodological procedures is to determine the level of genetic diversity among the individuals of the silver fir stands on the basis of appropriately selected and verified microsatellite markers. This methodology presents the use of DNA analyses by 17 nuclear microsatellite markers for genetic characterization. Microsatellites are small repetitive DNA sequences, they are highly polymorphic and represent codominant markers that enable to differentiate homozygotes from heterozygotes. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR) were used to genetic studies of *Abies alba* already at the end of the last century (KONNERT, BERGMANN 1995; VENDRAMIN et al. 1999; PARDUCCI et al. 2001; SAGNARD et al. 2002; HANSEN et al. 2005; CREMER et al. 2006, 2012; LIEPELT et al. 2009; PIOVANI et al. 2010; GÖMÖRY et al. 2012; POSTOLACHE et al. 2014).

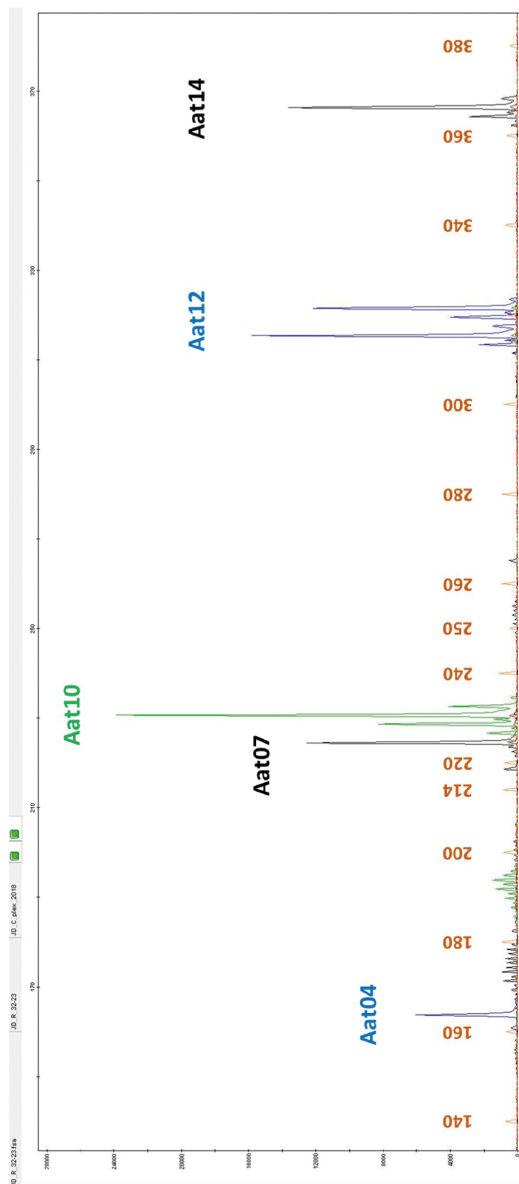
This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products and calculations of molecular data. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) from 100 mg of fresh needles or 20 mg of lyophilized needles. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR was optimized with the tested primers, whose oligonucleotide sequences had been developed by HANSEN et al. (2005), CREMER et al. (2006) and POSTOLACHE et al. (2014). The genetic diversity parameters are calculated, e. g. number of alleles, Shannon's information index, observed heterozygosity, expected heterozygosity, fixation index, pairwise population values of the genetic divergence, and Nei's genetic distance. For forestry purposes, it is necessary to characterize the level of genetic variability of the donor individuals from stands proposed to approval as sources of reproductive material using suitable DNA markers. According to the levels of genetic diversity of the individuals, the adaptive abilities of stands and their offspring can be derived.

PŘÍLOHA

Příklady výstupů genetických charakteristik šetřených populací jedle bělokoré



Obr. 1: Ukázka PCR amplifikačních produktů markeru Aat12 na gelovém nosiči po provedené elektroforéze získaných u 10 jedinců jedle bělokoré



Obr. 2: Příklad výstupu z fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500, záznam 3. běhu (analýzované markery Aat04, Aat07, Aat10, Aat12, Aat14) u vzorku jedle (JD_R_32) z lokality Rychnov nad Kněžnou

Tab. 3: Příklad párového porovnání získaných multilokusových genotypů ze 17 mikrosatelitových markerů u šetřených jedinců podle bělokoré.

Dva jedinci porostu liší se v 8 lokusech

Genotyp/ lokus	JD_R_25	JD_R_33	Genotyp/ lokus
Aag02	215/233	209/215	Aag02
NFF3	131/131	131/131	NFF3
NFH3	103/107	103/103	NFH3
SFb4	157/167	157/165	SFb4
SFb5	147/151	147/151	SFb5
SFg6	104/108	104/104	SFg6
Aag01	194/212	194/212	Aag01
Aat01	111/114	111/114	Aat01
NFF7	137/145	139/139	NFF7
NFH15	108/116	108/116	NFH15
SF1	216/219	186/216	SF1
SF78	230/260	240/260	SF78
Aat04	155/164	155/164	Aat04
Aat07	222/222	222/222	Aat07
Aat10	227/231	227/231	Aat10
Aat12	302/316	302/316	Aat12
Aat14	363/367	367/373	Aat14

Dva jedinci porostu liší se v 16 lokusech

Genotyp/ lokus	JD_R_04	JD_R_06	Genotyp/ lokus
Aag02	219/219	219/227	Aag02
NFF3	131/135	115/135	NFF3
NFH3	105/105	131/131	NFH3
SFb4	149/171	149/175	SFb4
SFb5	141/141	139/151	SFb5
SFg6	108/108	102/102	SFg6
Aag01	197/212	212/212	Aag01
Aat01	111/114	114/114	Aat01
NFF7	139/157	139/149	NFF7
NFH15	112/112	112/116	NFH15
SF1	216/216	219/219	SF1
SF78	200/240	222/254	SF78
Aat04	155/164	155/164	Aat04
Aat07	222/222	224/236	Aat07
Aat10	231/231	229/231	Aat10
Aat12	316/318	302/316	Aat12
Aat14	363/367	367/375	Aat14

V rámci jednoho porostu jsou porovnávání jedinci JD_R_25 a JD_R_33 geneticky více příbuzní než jedinci JD_R_04 a JD_R_06, kteří jsou mezi sebou geneticky významně vzdálení.



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 4/2023