

LESNICKÝ PRŮVODCE

**METODICKÉ POSTUPY DRUHOVÉ DETERMINACE
A STANOVENÍ GENETICKÉ DIVERZITY
TOPOLU ČERNÉHO (*POPULUS NIGRA* L.)
NA ZÁKLADĚ GENETICKÝCH ANALÝZ
S VYUŽITÍM MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ**



**Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
a kol.**



2/2024

**Metodické postupy druhové determinace
a stanovení genetické diverzity
topolu černého (*Populus nigra* L.)
na základě genetických analýz
s využitím mikrosatelitových markerů**

Certifikovaná metodika

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Ludka Čížková, Ph.D.

Bc. Kateřina Vítová

Ing. Olga Trčková

Lesnický průvodce 2/2024

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 978-80-7417-272-4

ISSN 0862-7657

METHODOLOGICAL PROCEDURES FOR SPECIES DETERMINATION AND FOR CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY IN BLACK POPLAR (*POPULUS NIGRA* L.) BASED ON GENETIC ANALYZES USING MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

The aim of this methodology is to present procedures of DNA analysis using microsatellite markers for species determination and for monitoring the genetic variability and the clonal identity in black poplars. 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 selected trees of black poplar from localities of Moravia and Bohemia were used to develop this methodology. In addition, 14 samples of *Populus deltoides* and 10 hybrids of *Populus ×canadensis* (obtained by controlled crosses between *Populus deltoides* Bartr. and *Populus nigra* L.) cultivated in the gene bank of the FGMRI were used as reference samples to detect the eventual occurrence of introgression in the monitored poplar trees. Diagnostic microsatellite markers (WPMS09, WPMS18, PMGC14, PMGC2163, PMGC456) were proved suitable for species determination and distinguishment of black poplar from hybrid poplar trees. Identifying pure black poplar using morphological traits alone is very difficult due to the frequent occurrence of intermediate and variable forms in nature. Selected polymorphic nuclear microsatellite markers (WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS19, WPMS21, WPMS22) proved suitable for finding the genetic parameters for verifying the levels of genetic diversity between different genotypes and for determination of clonal identity in case of vegetative reproduction of black poplar trees. Black poplar is pioneer deciduous tree with amelioration function and can be used as one of the alternative for reforestation of the lower altitudes. This species is native in the Czech Republic, but has been neglected and greatly reduced in the past. Using the presented methodology of DNA analysis, it will be possible to verify the species affiliation of the searched poplar trees to the black poplar, identify the genetic parameters of phenotypically high-quality individuals and to select suitable clones ensuring sufficient diversity for the establishment of propagation stands and for conservation strategies.

Key words: black poplar; hybrid detection; DNA analysis; microsatellite markers; species determination; genetic diversity; clonal identification

Oponenti:

Ing. Vlasta Knorová, DiS.

Ministerstvo zemědělství ČR
odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

Ing. Miroslav Válek

ÚHUL, Brandýs n. L.
pobočka Hradec Králové
Veverkova 1335
500 02 Hradec Králové 2

Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
FZT, Katedra rostlinné výroby
Na Sádkách 1780
370 05 České Budějovice

Adresa autorů:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Ludka Čížková, Ph.D.

Bc. Kateřina Vítová

Ing. Olga Trčková

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

e-mail: cvrckova@vulhm.cz

machova@vulhm.cz

ludka.cizkova@seznam.cz

vitova@vulhm.cz

trckova@vulhm.cz

Obsah:

I	CÍL METODIKY	7
II	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1	ÚVOD	7
2	METODICKÉ POSTUPY	9
2.1	Odběr vzorků a postupy izolace DNA	9
2.2	Postupy PCR amplifikace	11
2.3	Postupy elektroforézy v agarózovém gelu	18
2.4	Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů	19
2.5	Zpracování molekulárních dat	20
III	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	27
IV	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	29
V	EKONOMICKÉ ASPEKTY	31
VI	DEDIKACE	32
VII	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	33
VIII	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	36
	SUMMARY	38
	PŘÍLOHA	41

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 je představit metodické postupy DNA analýz s využitím vybraných diagnostických mikrosatelitových markerů pro rozlišení druhové příslušnosti topolu černého od hybridních topolů vzniklých spontánním křížením s topolem kanadským. Metodické postupy jsou založeny na ověřených poznatcích o druhově specifických velikostech alel diagnostických SSR markerů. Záměrem metodiky je možnost u vyhledávaných fenotypově kvalitních a geneticky diverzních jedinců topolů černých ověřit i jejich druhovou čistotu. Metodické postupy jsou využitelné při zachovávání genových zdrojů topolu černého a při zakládání množitelských porostů pro rozšíření původního druhu topolu černého jako vhodného alternativního druhu dřeviny při opětovném zalesnění poloh s nižší nadmořskou výškou 1. – 2. LVS a při obnově lužních ekosystémů.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 Úvod

V posledním desetiletí docházelo vlivem silných klimatických výkyvů a časově dlouhých období nedostatku vláhy k rozsáhlému poškození lesních porostů. V této souvislosti se pozornost upřela na hledání alternativních cest k obnově těchto porostů s cílem zachovat lesní ekosystémy. Významně poškozeny jsou i lokality jižní Moravy v oblastech lužních lesů, kde dochází k odumírání klimatickými vlivy oslabených pěstovaných porostů jasanů a olší působením houbových patogenů (Čížková et al. 2018).

Topol černý byl v minulosti přirozeně hojně zastoupen v porostech lužních lesů Moravy a Čech, ale vlivem lidské činnosti nyní patří mezi nejohroženější dřeviny v České republice (Čížková et al. 2020) a také v řadě dalších evropských zemích (HEINZE et al. 2008, RATHMACHER et al. 2010, ČORTAN et al. 2016). K redukci výskytu ve velkém měřítku došlo radikální změnou jeho přirozených stanovištních podmínek, a to rozsáhlými zásahy do přeměny krajiny způsobenými umělými

regulacemi říčních toků. Tím se silně omezila možnost generativní reprodukce, protože vývoj semenáčků vyžaduje specifické vlhkostní podmínky přirozeně se zaplavujících lužních lesů. Další redukcí způsobila umělá výsadba rychle rostoucích šlechtěných topolů *Populus ×canadensis*, vzniklých křížením topolů černého a bavlíkového, kdy navíc mohlo docházet ke spontánnímu křížení těchto hybridů s topolem černým, a tím k degradaci stávajícího genofondu topolu černého (HEINZE et al. 2008, RATHMACHER et al. 2010). V Červeném seznamu ohrožených druhů rostlin České republiky je topol černý zařazen do kategorie kriticky ohrožených druhů (HRČKA 2016).

V řadě evropských zemí jsou realizovány aktivity využívající genetické analýzy pro záchranu genofondu topolu černého jako zdrojů reprodukčního materiálu (dále jen „ZRM“) pro možnost jeho zpětného rozšíření a začlenění do porostů při obnově lužních ekosystémů s nevhodnou stávající skladbou porostů v měnících se klimatických podmínkách. Pro získání genofondu topolu černého se ověřuje druhová příslušnost jedinců s využitím diagnostických mikrosatelitových (SSR) markerů (FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008b, RATHMACHER et al. 2010, ULUĞ et al. 2022) na základě specifických velikostí alel. Mikrosatelity představují krátké repetice, nejčastěji složené ze 2–4 bází nukleotidových motivů, které se u jedinců liší jejich počtem, tedy délkou mikrosatelitových lokusů. SSR markery mají kodo-dominantní charakter, což umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. Pomocí polymorfních mikrosatelitů se zjišťuje i úroveň diverzity vyhledaných ZRM pro získání dostatečně variabilního reprodukčního materiálu (SMULDERS et al. 2008a, 2008b, RATHMACHER et al. 2010, TRÖBER, WOLF 2015, ČORTAN et al. 2016, CIFTCI et al. 2017, WÓJKIEWICZ et al. 2021). Topol černý se svými biologickými vlastnostmi pionýrské dřeviny jeví být vhodným alternativním druhem dřeviny jako součást obnovovaných porostů pro výsadbu poškozených lokalit podél vodních toků v nižších nadmořských výškách.

Představené metodické postupy jsou využitelné pro současné zjišťování úrovně genetické diverzity stromů topolu černého, identifikaci geneticky identických jedinců a pomocí 5 druhově diagnostických markerů pro determinaci druhové čistoty vybraných jedinců topolu černého pro možnost jejich navržení k uznání za zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu za účelem zachování stávajícího genofondu ohroženého druhu. Metodické postupy mohou také uplatnit správci vodních toků při obnově břehových porostů.

2 Metodický postup

2.1 Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro získání kvalitních izolátů DNA je nejvhodnějším termínem odběru rostlinného materiálu jarní období, kdy lze odebírat pupeny nebo mladé listy. Při použití starých listů se z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů snižuje kvalita i kvantita izolované DNA. Nevyhovující kvalita výchozího DNA eluátu může zkomplikovat nebo znemožnit navazující analýzy. Při zpracování vyššího počtu vzorků je výhodnější odebírat mladé listy, protože zpracování pupenů je časově náročnější. Během manipulace se vzorky jednotlivých stromů je nutné pečlivé vedení evidence, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se již při odběru označí, uloží do mikroténového sáčku a udržují při nízké teplotě přibližně 4 °C (např. lze použít chladicí tašky s namraženými destičkami), abychom zabránili degradaci DNA. Ideální je vzorky co nejrychleji přepravit ke zpracování do laboratoře. DNA lze izolovat z čerstvého, zmrazeného nebo lyofilizovaného rostlinného materiálu. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, nastříhání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do -20 °C. Další možností, jak dlouhodobě uchovat vzorky, je jejich vysušení s využitím lyofilizátoru a poté jejich vzduchotěsné uzavření. Lyofilizovaný materiál lze skladovat při pokojové teplotě a snadněji se s ním manipuluje před homogenizací. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se v naší laboratoři nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN (Qiagen, Hilden, Germany) dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Tato metoda izolace je poměrně časově nenáročná a získají se dostatečně kvalitní DNA eluáty. Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátním pufrům AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívát na 65 °C. Případné sraženiny v pufrách AP1 a AW1 se odstraní nahřátím.

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

1. Maximální množství výchozího rostlinného materiálu je 100 mg čerstvého pletiva nebo 20 mg lyofilizovaného pletiva, rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách, případně lze využít homogenizátor rostlinného materiálu (např. Precellys' Evolution Touch, Bertin Technologies, France). Utřený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

2. K rozdrcenému vzorku se napipetuje 400 μ l pufru AP1 a následně 4 μ l 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 $\times$ převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 μ l 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 (dále jen „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 pomocí mikropipety vzniklou směs promícháme.
7. Odpipetujeme 650 μ l 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 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

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladicí blok na mikrozkuhavky

(-20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, třecí misky a tloučky, sada pipet a příslušné sterilní špičky, sterilní mikrozkuhavky Eppendorf 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor, homogenizátor.

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 s využitím spektrofotometru 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.

2.2 Postupy PCR amplifikace

Pro možnost analýzy vybraných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR) v izolované DNA zkoumaných stromů topolů musí proběhnout jejich amplifikace s využitím PCR (polymerázové řetězové reakce). Pro druhovou determinaci topolu černého byly použity diagnostické mikrosatelitové markery WPMS09 a WPMS18 (FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008b, RATHMACHER et al. 2010, ULUĞ et al. 2022). U těchto markerů byly v naší laboratoři u referenčních vzorků topolu bavlíkového zjištěny specifické velikosti alel v homozygotní formě. U referenčních vzorků šlechtěných hybridních topolů (kříženci topolu bavlíkového a černého) byly tyto specifické hodnoty alel detekovány v heterozygotní formě.

Pro současné zjišťování úrovně genetické diverzity stromů topolů a ověřování geneticky identických jedinců byly amplifikace dvou druhově diagnostických markerů přiřazeny do PCR amplifikací mikrosatelitových markerů již dříve ověřených pro zjišťování genetické diverzity topolu černého (CVRČKOVÁ et al. 2022). Sekvence primerů (Tab. 1) všech zvolených jaderných mikrosatelitových markerů WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS09, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS18, WPMS19, WPMS21, WPMS22 byly publikovány autory VAN DER SCHOOT et al. (2000) a SMULDERS et al. (2001). Pro PCR amplifikaci rozšířeného spektra markerů byly optimalizovány koncentrace reakčních směsí příslušných chemických komponent (Tab. 2) a teplotní cykly polymerázových řetězových reakcí jednotlivých multiplexů (Tab. 3, 4, 5) pro získání reprodukovatelných a velikostně

příslušných amplifikátů použitých lokusů. Pro odečtení velikostí amplifikovaných fragmentů v párech bází (bp) na genetickém analyzátoru se musí použít fluorescenčně značené primery, získané syntézou u komerční firmy. Optimalizace reakcí probíhaly i za účelem seskupení PCR amplifikací do multiplexů, aby z důvodu časových a finančních úspor mohly probíhat analýzy minimálně dvou a více markerů najednou. PCR amplifikace 13 vybraných markerů byly sestaveny do tří multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů a průběhů reakčních podmínek. Další mikrosatelitové markery použité pro druhovou determinaci topolu černého byly markery PMGC14, PMGC2163, PMGC456 (FOSSATI et al. 2003, KHASA et al. 2003, LIESEBACH et al. 2010, SMULDERS et al. 2008b, RATHMACHER et al. 2009, ULUĞ et al. 2022). Sekvence primerů markerů PMGC14, PMGC2163 byly převzaty z publikace ULUĞ et al. (2022) a primerové sekvence mikrosatelitu PMGC456 z publikace KHASA et al. (2005). U amplifikačních produktů mikrosatelitových lokusů PMGC2163, PMGC456 byly zjištěny specifické velikosti alel v homozygotní formě u topolu bavlíkového, tyto velikosti alel se nevyskytovaly u stromů topolu černého, ale vyskytovaly se u hybridních topolů. V případě markeru PMGC14 byly v naší laboratoři zjištěny 3 specifické velikosti alel u vzorků topolu bavlíkového, které se nevyskytovaly u vzorků topolu černého, ale byly zastoupeny ve spektru velikostí alel pro hybridní topoly. PCR amplifikace těchto 3 diagnostických markerů probíhaly společně v rámci jednoho multiplexu (Tab. 6 a 7). Reakční chemikálie je nutné udržovat v chladu a přípravu reakční směsi je potřebné dělat na ledu nebo chladové destičce. DNA polymerázu musíme neustále uchovávat při -20 °C a pipetujeme ji do reakční směsi až nakonec jen s krátkým vyjmutím z mrazicího boxu.

Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

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

WPMS01 F – 2 μM (VIC), WPMS01 R – 2 μM

WPMS04 F – 2 μM (PET), WPMS04 R – 2 μM

WPMS11 F – 3 μM (NED), WPMS11 R – 3 μM

WPMS13 F – 1 μM (6FAM), WPMS13 R – 1 μM

WPMS19 F – 1 μM (6FAM), WPMS19 R – 1 μM

Ředění primerů:

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.

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy, sekvence primerů a rozmezí velikostí v počtu bází sledovaných lokusů získané ze sledovaných stromů topolů

Lokus/motiv repetic	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
WPMS01 (GA) ₂₀	F: AACCACTATGCCACCTTCTT R: AACTAACTCCATTTCATTGCTAAA	111–165
WPMS04 (GT) ₂₅	F: TACACGGGTCTTTTATTCTCT R: TGCCGACATCCTGCGTTCC	231–319
WPMS07 (GT) ₂₄	F: ACTAAGGAGAATTGTTGACTAC R: TATCTGGTTTCCTCTTATGTG	213–271
WPMS09 (GT) ₂₁ (GA) ₂₄	F: CTGCTTGCTACCGTGGAACA R: AAGCAATTTGGGTCTGAGTATCTG	232–294
WPMS10 (GT) ₂₃	F: GATGAGAAACAGTGAATAGTAAGA R: GATTCCCAACAAGCCAAGATAAAA	224–266
WPMS11 (GT) ₂₆	F: TAAAGATGATGGACTGAAAAGGTA R: TAAAGGAGAATATAAGTGACAGTT	175–227
WPMS13 (GT) ₂₂	F: GATCCTGAACAATGTCGTACTTC R: ACGATAACCTGCGAGAAATGT	102–144
WPMS14 (CGT) ₂₈₋₃	F: CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC R: GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	228–288
WPMS16 (GTC) ₈ (ATCCTC) ₅	F: CTCGTAATAATTTCCGATGATGACC R: AGATTATTAGGTGGGCCAAGGACT	133–163
WPMS18 (GTG) ₁₃	F: CTTACATAGGACATAGCAGCATC R: CTTACATAGGACATAGCAGCATC	214–241
WPMS19 (CAG) ₂₈₋₃	F: AGCCACAGCAAATTCAGATGATGC R: CCTGCTGAGAAGACTGCCTTGACA	185–245
WPMS21 (GCT) ₄₅₋₁₂	F: TGCTGATGCAAAAAGATTTAG R: TTGGAACCTTCAACATTTCAGAT	258–327
WPMS22 (TGA) ₂₃	F: ACATGCTACGTGTTTGGAATG R: ATCGTATGGATGTAATTGTCTTA	82–160
PMGC14 (CTT)	F: TTCAGAATGTGCATGATGG R: GTGATGATCTCACCGTTTG	184–223
PMGC2163 (GA)	F: CAATCGAAGGTAAGGTTAGTG R: CGTTGGACATAGATCACACG	185–251
PMGC456 (GA)	F: TGTAGGAGATATCCACGTGG R: AACAAATATGCTTCATAGCACAG	76–84

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris – HCl, pH 8,0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů WPMS01 F – 2 μ l WPMS01 R – 2 μ l, WPMS04 F – 2 μ l, WPMS04 R – 2 μ l, WPMS11 F – 3 μ l, WPMS11 R – 3 μ l, WPMS13 F – 1 μ l, WPMS13 R – 1 μ l, WPMS19 F – 1 μ l, WPMS19 R – 1 μ l a doplníme 82 μ l TE pufru).

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

Tab. 2: Složení reakční směsi na PCR amplifikaci

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 $\times$ PCR Buffer, minus Mg	1,5 μ l
50 mM MgCl ₂	0,6 μ l
10 mM dNTPs (2,5 mM každý)	0,2 μ l
Primer mix	0,75 μ l
Polymerase Platinum Taq	0,075 μ l
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma-Aldrich)	10,875 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

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

Tab. 3: Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
30 $\times$ opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	53 °C	30 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	60 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1 $\times$			
5.	72 °C	10 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

WPMS07 F – 2 μ M (PET), WPMS07 R – 2 μ M

WPMS10 F – 2 μ M (VIC), WPMS10 R – 2 μ M

WPMS16 F – 2 μ M (VIC), WPMS16 R – 2 μ M

WPMS18 F – 2 μ M (NED), WPMS18 R – 2 μ M

WPMS22 F – 2 μ M (6FAM), WPMS22 R – 2 μ M

Ředění primerů:

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace jako u multiplexu 1.

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů WPMS07 F – 2 μ l, WPMS07 R – 2 μ l, WPMS10 F – 2 μ l, WPMS10 R – 2 μ l, WPMS16 F – 2 μ l, WPMS16 R – 2 μ l, WPMS18 F – 2 μ l, WPMS18 R – 2 μ l, WPMS22 F – 2 μ l, WPMS22 R – 2 μ l a doplníme 80 μ l TE pufru).

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.

Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci je stejné jako u multiplexu 1.

Tab. 4: Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
30 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	55 °C	45 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	105 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1×			
5.	72 °C	10 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Multiplex 3 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

WPMS09 F – 2 μ M (NED), WPMS09 R – 2 μ M

WPMS14 F – 1 μ M (6FAM), WPMS14 R – 1 μ M

WPMS21 F – 2 μ M (VIC), WPMS21 R – 2 μ M

Ředění primerů:

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace dle příkladu multiplexu 1.

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů WPMS09 F – 2 μ l, WPMS09 R – 2 μ l, WPMS14 F – 1 μ l, WPMS14 R – 1 μ l, WPMS21 F – 2 μ l, WPMS21 R – 2 μ l a doplníme 90 μ l TE pufru).

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.

Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci stejné jako u multiplexu 1.

Tab. 5: Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	3 min	Počáteční denaturace
30 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	60 °C	45 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	105 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1×			
5.	72 °C	10 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Multiplex 4 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

PMGC14 F – 0,5 μ M (6FAM), PMGC14 R – 0,5 μ M

PMGC2163 F – 0,5 μ M (VIC), PMGC2163 R – 0,5 μ M

PMGC456 F – 0,5 μ M (NED), PMGC456 R – 0,5 μ M

Ředění primerů:

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace dle příkladu multiplexu 1. Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 200 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů PMGC14 F - 1 μ l, PMGC14 R - 1 μ l, PMGC2163 F - 1 μ l, PMGC2163 R - 1 μ l, PMGC456 F - 1 μ l, PMGC456 R - 1 μ l, a doplníme 194 μ l TE pufru).

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15 μ l na 1 vzorek s využitím QI-AGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Tab. 6: Složení reakční směsi na PCR amplifikaci

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7,5 μ l
primer mix	1,5 μ l
RNase – free water	3,5 μ l
Q-Solution	1,5 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA (10-50 ng)	

Tab. 7: Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
30 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	52 °C	90 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	60 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1×			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikrozkušavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladič box na PCR mikrozkušavky, chladič destička nebo ledová tříšť, centrifuga, teplotní cyklovač

2.3 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 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 × TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se pipetují PCR amplifikáty (15 µl) smíchané se 4 µl pufru (gel loading buffer, Sigma-Aldrich). Pro porovnání 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 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 WPMS11 je uveden v příloze (Obr. 2).

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a sterilní špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, fluorescenční dokumentační systém gelů

2.4 Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Zjištění přesné velikosti amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymérazová 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 amplifikátů analyzovaných lokusů je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti alel a fluorescenčního zabarvení primerů.

Amplifikace 13 mikrosatelitových markerů byly sestaveny do tří multiplexů a navazující fragmentační analýzy probíhají podle multiplexů ve třech bězích. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (WPMS01, WPMS04, WPMS11, WPMS13, WPMS19), v druhém běhu probíhá fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (WPMS07, WPMS10, WPMS16, WPMS18, WPMS22) a ve třetím běhu multiplexu 3 (WPMS09, WPMS14 a WPMS21). Pro další diagnostické markery PMGC14, PMGC2163, PMGC456 sestavené pro amplifikaci do 4. multiplexu byly fragmentační analýzy realizovány formou čtvrtého běhu. Po provedené denaturaci se destička vkládá do genetického analyzátoru. Ukázky výstupů fragmentačních analýz z genetického analyzátoru pro jedince topolu černého, topolu bavlníkového a kanadského u diagnostického markeru PMGC2163 jsou uvedeny v příloze (Obr. 3).

Odečtení velikostí v hodnotách párů bází (bp) u amplifikovaných lokusů 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 sterilní špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, 96jamkové destičky příslušné k analyzátoru, genetický analyzátor

2.5 Zpracování molekulárních dat

Jaderné mikrosatelitové markery jsou specifické úseky DNA s kodominantním charakterem. U topolu černého, bavlníkového, kanadského a hybridů topolů s diploidní sadou chromozómů ($2n$) to znamená, že u sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě shodné velikosti alel v případě homozygota a v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Rozmezí velikostí alel získaných pro jednotlivé lokusy pro námi sledované stromy topolu černého a identifikovaných hybridů a referenční vzorky (vzorky topolu bavlníkového a vzorky šlechtěných hybridů topolu kanadského) jsou uvedena v tabulce 8.

Získaný přehled hodnot alel u hodnocených lokusů pro jednotlivé stromy topolů (vypracovaná multilokusová genotypizace – MLG) se statisticky zpracovává, např. za využití programů GenAEx 6.503 (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 sledovaných stromů, porostů a mikrosatelitových markerů. Pro kontrolu velikostí odečtených hodnot mikrosatelitových lokusů včetně ohodnocení frekvence nulových alel lze použít software Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al. 2004).

K vypracování metodických postupů pro druhovou determinaci topolu černého byla využita sada 14 referenčních vzorků (geneticky odlišných klonů) topolu

Tab. 8: Rozmezí velikostí alel v počtu párů bází (bp) mikrosatelitových markerů získaných z analýz stromů topolů

Rozmezí velikostí alel v počtu párů bází (bp)				
Lokusy	Topol černý	Topol bavlníkový	Topol kanadský šlechtěný	Hybridní topoly
WPMS01	113–165	111–113	111–151	111–151
WPMS04	231–319	–	249–275	249–285
WPMS07	213–271	223–269	221–259	221–267
WPMS09	240–294	232	232–260	232–264
WPMS10	224–266	230–236	230–244	230–258
WPMS11	175–227	175–177	175–197	175–189
WPMS13	104–144	102–104	102–140	102–138
WPMS14	228–285	234–288	231–276	246–276
WPMS16	136–163	133–139	133–148	133–151
WPMS18	220–241	214	214–229	214–229
WPMS19	185–245	191–224	188–236	203–236
WPMS21	258–327	267–324	264–312	270–312
WPMS22	82–160	139	82–145	85–133
PMGC14	199–223	184,190,193	190–223	190–223
PMGC2163	217–251	185	185–249	185–249
PMGC456	76–78	82	76–84	76–82

bavlníkového (*Populus deltoides*) a 10 referenčních vzorků (odlišných genotypů) šlechtěných hybridních topolů *Populus ×canadensis* pěstovaných ve výzkumné stanici VÚLHM, v. v. i. v Kunovicích. Identifikovat stromy topolu černého lze s využitím 2 diagnostických mikrosatelitových markerů WPMS09 a WPMS18 na základě určení velikosti alel těchto markerů u jedinců topolu černého a u referenčních vzorků topolu bavlníkového. U geneticky různých 14 klonů topolu bavlníkového byly v naší laboratoři (obdobně s výsledky studií autorů zahraničních laboratoří: FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008a, RATHMACHER et al. 2010) v markerech WPMS09 a WPMS18 získány v homozygotní formě specifické uniformní velikosti alel (Tab. 9). Současně se jedná o nejnižší velikost alel v porovnání s variabilními alelami zjištěnými u stromů určených jako topol černý. U markeru WPMS09 byly pro všechny referenční klony topolu bavlníkového získány alely se stejnou

Tab. 9: Specifické velikosti alel v diagnostických markerech WPMS09, WPMS18, PMGC14, PMGC2163, PMGC456, pro referenční vzorky topolu bavlníkového (*Populus deltoides*) v lokusu WPMS04 nebyly získány PCR amplifikáty

Mikrosatelitové lokusy	WPMS09		WPMS18		WPMS04		PMGC14		PMGC2163		PMGC456	
Referenční vzorky	Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)	
<i>P.d._01</i>	232	232	214	214	-	-	190	190	185	185	82	82
<i>P.d._02</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82
<i>P.d._03</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82
<i>P.d._04</i>	232	232	214	214	-	-	190	190	185	185	82	82
<i>P.d._05</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82
<i>P.d._06</i>	232	232	214	214	-	-	190	190	185	185	82	82
<i>P.d._07</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82
<i>P.d._08</i>	232	232	214	214	-	-	190	190	185	185	82	82
<i>P.d._09</i>	232	232	214	214	-	-	184	193	185	185	82	82
<i>P.d._10</i>	232	232	214	214	-	-	184	193	185	185	82	82
<i>P.d._11</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82
<i>P.d._12</i>	232	232	214	214	-	-	184	193	185	185	82	82
<i>P.d._13</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82
<i>P.d._14</i>	232	232	214	214	-	-	193	193	185	185	82	82

(homozygotní) hodnotou 232 a u markeru WPMS18 to byly uniformní alely 214. Zároveň velikosti alel 214 a 232 byly diagnostikovány převážně v heterozygotní formě u referenčních vzorků topolu kanadského (Tab. 10). U markeru WPMS04 při stejných PCR podmínkách nebyly získány amplifikáty pro klony topolu bavlíkového, ale u hybridních topolů (Tab. 9 a 10) a topolů černých (rozmezí velikostí alel je uvedeno v tabulce 8) amplifikace proběhla. Metodické postupy druhové determinace byly ověřovány na čtyřech stech vzorcích odebraných z topolů v povodí řek Dyje, Morava, Olše, Jihlava, Odry, Labe a Ohře. V tomto souboru bylo u 37 topolů na základě druhově specifických velikostí alel diagnostických markerů zjištěno, že to jsou hybridy. Dále byla u všech stromů přiřazených k topolům černým zjištěna absence konkrétních velikostí alel i u dalších markerů WPMS01, WPMS07, WPMS10, WPMS 13, WPMS16. Zjištěné velikosti alel se vyskytovaly v různých frekvencích u referenčních vzorků topolu bavlíkového a kanadského topolu a u námi v terénu zjištěných hybridních topolů (Tab. 11) i tento poznatek přispívá k potvrzení druhové příslušnosti. Získané rozlišení u námi šetřených stromů topolů na druhy černý, bavlíkový a hybridní topoly významně podpořily vý-

Tab. 10: Velikosti alel v diagnostických markerech WPMS09, WPMS18, PMGC14, PMGC2163, PMGC456 u 10 referenčních vzorků šlechtěných hybridních klonů topolu kanadského a velikosti alel u lokusu WPMS04

Mikrosatelitové lokusy	WPMS09		WPMS18		WPMS04		PMGC14		PMGC2163		PMGC456	
Referenční vzorky	Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)		Allele sizes (bp)	
Robusta	232	250	214	214	255	255	190	223	185	223	76	82
SP-01	260	260	214	229	255	255	190	223	185	223	76	82
SP-02	250	250	214	226	275	275	193	202	185	201	78	82
SP-03	232	250	214	214	255	255	190	223	185	223	76	82
SP-04	232	260	214	229	255	255	193	211	185	223	76	82
SP-05	232	258	214	229	255	255	190	205	185	239	76	82
SP-06	232	250	214	214	255	255	190	223	185	249	76	82
SP-07	252	252	214	223	249	249	190	199	185	227	76	82
SP-08	232	250	214	223	255	255	190	208	185	239	76	82
SP-09	250	250	214	226	275	275	193	205	185	243	76	82

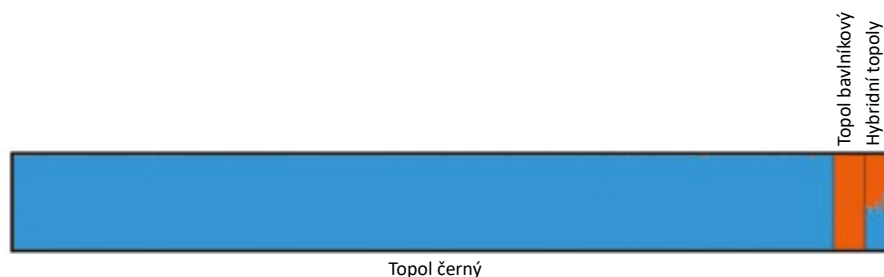
sledky analýz dalších 3 diagnostických markerů PMGC14, PMGC2163, PMGC456, pro které byly obdobně s publikovanými výsledky (KHAŠA et al. 2003, FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008b, RATHMACHER et al. 2009, ULUĞ et al. 2022) získány specifické velikosti alel v závislosti na druhu topolu (Tab. 8, 9 a 10). U markeru PMGC14 (Tab. 9) byly pro referenční vzorky topolu bavlníkového získány 3 hodnoty alel (184, 190, 193), které se vyskytovaly u hybridních topolů, ale u topolů černých se tyto velikosti alel nevyskytovaly. U vzorků topolu černého byly zjištěny velikosti alel v rozmezí od 199 do 223. U markeru PMGC2163 (Tab. 9) byla pro referenční vzorky topolu bavlníkového získána specifická uniformní velikost alely 185 (v homozygotní formě), u hybridních topolů byly zjištěny alely s rozpětím hodnot 185–249 a alela o velikosti 185 se vyskytovala u hybridních stromů v heterozygotní formě, u topolu černého se spektrum velikostí alel tohoto markeru pohybovalo až od hodnoty 217 do 251. U markeru PMGC456 (Tab. 9) byla u topolu bavlníkového zjištěna opět uniformní velikost alely s hodnotou 82 (homozygotní forma), tato specifická velikost alely byla detekována u hybridních topolů v heterozygotní formě (rozmezí velikostí alel pro hybridní topoly bylo 76–84). U topolu černého se u tohoto markeru vyskytovaly alely o velikosti 76 a 78.

Sledovat genetické rozdíly mezi stromy topolu černého a hybridních topolů lze také na základě porovnávání genetických struktur. K odvození struktur se využívá Bayesianáská klastrová metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Podkladem

Tab. 11: Frekvence alel unikátních pro referenční vzorky topolu bavlníkového a topolu kanadského a určených hybridů vyskytujících se v lokalitách topolu černého

	Alela (bp)	Topol černý	Topol bavlníkový	Topol kanadský	Hybridní topoly
WPMS01	113	0	0,93	0,45	0,5
WPMS07	229	0	0,25	0,15	0,028
WPMS09	232	0	1	0,30	0,028
WPMS10	230	0	0,57	0,50	0,5
WPMS13	102	0	0,79	0,40	0,069
WPMS16	133	0	0,21	0,10	0,167
WPMS18	214	0	1	0,65	0,597

pro STRUCTURE analýzu jsou multilokusová data vybraných polymorfních nSSR jaderných mikrosatelitových markerů a výsledkem jsou profily genetických struktur barevně rozlišené podle počtu klastrů (K). Optimální hodnotu K lze stanovit na základě výsledků programu STRUCTURE SELECTOR (LI, LIU 2018). Genetické struktury se kvantifikují procentuálními podíly získaných klastrů (znázorněné různými barvami). Pro rozlišení sledovaných druhů a hybridů topolů byla zpracována analýza Structure, jejíž výsledek dokumentuje Obr. 1. V provedené analýze se jednotlivé skupiny (vzorky topolu černého, referenční vzorky topolu bavlníkového a topolu kanadského) strukturovaly do barevně odlišných profilů. Při použití softwarově stanovené optimální hodnoty $K = 2$ vykazují vzorky čistých druhů odlišnou barvu a hybridní vzorky mají strukturu dvoubarevnou. Provedená analýza Structure ukazuje rozlišení sledovaných druhů topolů.



Obr. 1: Výsledky structure analýzy pro $K = 2$ pro vzorky topolu černého, topolu bavlníkového a hybridních topolů

U determinovaných topolů černých vybraných na využití za zdroje reprodukčního materiálu je účelné ohodnotit jejich genetickou kvalitu. Statistickým zpracováním výsledků analýz vybraných 13 mikrosatelitových markerů lze v porostech topolu černého sledovat úroveň genetické diverzity, alelické varianty, frekvence alel, genetické diference, 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). V případě ověřování klonové identity se porovnávají hodnoty alel sledovaných lokusů u jedinců (ramet) příslušných klonů (ortetů) v rámci vypracované multilokusové genotypizace (MLG) – přehled hodnot alel sledovaných lokusů – pro šetřené klony. Příslušnost jedince ke klonu je deklarovaná, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů.

Pro získání variabilních zdrojů reprodukčního materiálu (ZRM) je potřebné zhodnotit vzájemnou genetickou příbuznost mezi stromy a vyloučit geneticky identické nebo blízké stromy. Hodnocení probíhá na základě párového porovnání získaných multilokusových genotypů u šetřených stromů s využitím statistického programu (např. GenAlEx 6.503). Pro optimální vypovídací hodnotu při sledování identity nebo diverzity topolů černých byl výběr mikrosatelitových markerů zaměřen na markery dostatečně polymorfní a zároveň s vyrovnanější frekvencí zastoupených velikostí alel. Pro determinaci druhové příslušnosti topolů je nutné do analýz zařadit diagnostické markery a podle zjištěné velikosti jejich alel je možné rozlišit druhy (topol černý a topol bavlíkový) a hybridy topolů.

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodické postupy druhové determinace topolu černého na základě molekulárních analýz nebyly dosud pro podmínky ČR publikovány. Uvedené metodické postupy rozšiřují dříve publikovanou metodiku zaměřenou na ověřování genetické variability u topolu černého s využitím DNA analýz mikrosatelitových markerů. Vzhledem k možnému narušení přirozeného původního genofondu topolu černého vysazovanými šlechtěnými topoly, které vznikly křížením topolu černého s topolem bavlíkovým, je potřebné mít vypracovány spolehlivé postupy druhové determinace. Morfologické znaky topolu černého nejsou vždy jednoznačné a jsou během vývojových fází růstu stromů proměnlivé. Pro spolehlivější druhovou determinaci lze využít molekulární markery a sledovat nežádoucí introgresi do genomu topolu černého prostřednictvím DNA analýz. Představené metodické postupy popisují využití diagnostických mikrosatelitových markerů WPMS09, WPMS18, PMGC14, PMGC2163, PMGC456 s druhově specifickými velikostmi alel pro odlišování topolu černého od jeho možných hybridů s topolem bavlíkovým. Dalším pomocným ukazatelem pro druhovou determinaci topolu černého je zjištění, že v markerech WPMS01, WPMS07, WPMS10, WPMS13 a WPMS16 se vyskytují specifické velikosti alel u topolu bavlíkového a jeho hybridů, zatímco u stromů přiřazených k topolům černým nebyly tyto velikosti alel zjištěny. Zároveň s determinací druhu je u vyhledaných a určených topolů černých pro jejich využití za zdroje reprodukčního materiálu důležité ověřit i genetickou diverzitu, pro jejichž charakterizaci metodika popisuje postupy analýz 13 mikrosatelitových markerů WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS09, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS18, WPMS19, WPMS21, WPMS22 (VAN DER SCHOOT et al. 2000, SMULDERS et al. 2001). Markery WPMS09 a WPMS18 vybrané pro druhovou determinaci byly z úsporných důvodů pro PCR amplifikace přidány do multiplexů markerů využitých pro sledování diverzity. Další druhově diagnostické markery PMGC14, PMGC2163, PMGC456 mají specifickou PCR amplifikaci a jsou uspořádány do samostatného multiplexu. Metodika podrobně popisuje optimalizované postupy DNA analýz pro získání reprodukovatelných výsledků, zahrnující získání eluátů DNA, postupy PCR amplifikací mikrosatelitových lokusů, postupy fragmentačních analýz na genetickém analyzátoru a zpracování molekulárních dat. Pro optimální vypovídací hodnotu úrovně diverzity mezi jedinci byl výběr zaměřen na mikrosatelity nejen dostatečně polymorfní, ale i s vyrovnanější frekvencí zastoupených alel. Výsledkem fragmentačních analýz je vypracovaná da-

tabáze, kterou představují u šetřených jedinců velikosti alel k jednotlivým lokům. Po statistickém zpracování genetických veličin získáme informace o genetických charakteristikách u sledovaných topolů i použitých markerů. Pro zhodnocení genetické příbuznosti mezi topoly a informaci o identických genotypech v případě vegetativně namnožených stromů lze provést párové porovnání získaných multi-locusových genotypů s využitím statistického programu (např. GenALEx 6.503). Představené analýzy vybraných markerů byly ověřeny na přibližně čtyřech stech vyhledaných jedincích topolů a referenčních vzorcích topolu bavlíkového a topolu kanadského (*šlechtěných hybridních topolů*). Pro záchranu a reprodukci druhů je podstatné zastoupení co nejširšího spektra genotypů, kdy lze předpokládat i výskyt genů s potenciálem přizpůsobit se změnám a výkyvům životních podmínek. Proto je důležité vybrat za zdroje reprodukčního materiálu správně druhově determinované a dostatečně diverzní stromy.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Předložené metodické postupy založené na analýzách DNA se uplatní pro ověřování druhové příslušnosti stromů topolu černého a sledování úrovně jejich diverzity. Správná determinace druhu topolu černého významně přispívá k záchraně jeho kriticky ohroženého genofondu. Druhově ověřené a dostatečně diverzní stromy se uplatní jako zdroje reprodukčního materiálu.

Topol černý byl v minulosti lidskou činností silně redukován a za ohroženou dřevinu je považován již od poloviny 20. století (Čížková et al. 2020). Vedle rozsáhlé a nepříznivé přeměny jeho přirozených stanovišť docházelo k hromadné výsadbě topolu kanadského (vzniklého křížením topolu bavlíkového a černého) a šířením pylu z těchto kříženců může docházet k introgresi genů topolu bavlíkového do původního genofondu topolu černého. V Červeném seznamu ohrožených druhů rostlin České republiky je topol černý zařazen do kategorie kriticky ohrožených druhů (Hrčka 2016). Záchrana ohroženého genofondu topolu černého je řešena i v rámci mezinárodní spolupráce (EUFORGEN, IUFRO). Zachování a zpětné rozšiřování tohoto lesnicky opomíjeného autochtonního druhu topolu je v současné době významné v souvislosti s hromadným odumíráním hospodářsky významných dřevin v nižších polohách, jako jsou např. jasanů a olše, v důsledku působení nepříznivých klimatických změn a houbových patogenů (Čížková et al. 2020). Topol černý přirozeně se vyskytující v povodí toků nejnižších zeměpisných poloh je svým pionýrským charakterem růstu vhodnou součástí dřevinné skladby pro rychlé znovuzalesnění rozsáhlých ploch v oblasti lužních lesů. K obnově lesa přispívají topoly jako přípravné dřeviny s meliorační funkcí a částečně mohou nahrazovat i produkci dřeva. Při zakládání porostů odolných k výkyvům klimatických podmínek je podstatné vycházet z dostatečně geneticky variabilní množitelské základny, což lze ověřovat na základě analýz DNA.

Popsané metodické postupy ověřování druhové čistoty a úrovně genetické diverzity vedoucí k záchraně genových zdrojů topolu černého, který se již vyskytuje jen ve zbytkových porostech nebo v jedincích, budou sloužit pro potřeby státní správy a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem). Další uplatnění získaných znalostí o druhové čistotě a geneticky podmíněné proměnlivosti topolů černých se předpokládá při aktualizaci souvisejících legislativních předpisů v ob-

lasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem a jako podkladů pro aktualizace Oblastních plánů rozvoje lesa.

Poznatky vedoucí k záchraně genových zdrojů kriticky ohroženého druhu dřeviny 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 a mezinárodní závazky České republiky při ochraně biologické rozmanitosti.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných jaderných mikrosatelitových lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Představené postupy byly odzkoušeny na vybraných jedincích topolu černého a referenčních vzorcích topolu bavlíkového a topolu kanadského. Příklady výstupů DNA analýz jsou uvedeny v příloze.

Možnosti uplatnění může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení především genetického analyzátoru pro fragmentační analýzy. Lze je objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV).

V EKONOMICKÉ ASPEKTY

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k možnosti determinace druhové čistoty topolu černého a k poznatkům o úrovni genetické variability a klonové identifikaci reprodukčních zdrojů topolu černého je přínos pro lesní hospodářství, které při aktuální potřebě řešit obnovu lužních lesů může při výsadbě topolu černého použít reprodukční materiál s potvrzenou druhovou identifikací a se zajištěnou vysokou úrovní genetické diverzity. Metodické postupy mohou být také využity správci vodních toků při obnově břehových porostů.

Na území ČR dochází k významným ztrátám původního genofondu topolu černého z důvodu nedostatku vhodných stanovišť pro jeho generativní reprodukci a v minulosti realizovanými výsadbami šlechtěných topolů. Jejich možným spontánním křížením s domácími černými topoly mohou vznikat hybridní formy topolů. Pro zachování genofondu topolu černého na území ČR je nutné určit jedince autochtonního topolu černého a jedince hybridního charakteru. Správné určování druhu je nezbytné pro účinnou ochranu a obnovu populací topolu černého jako kriticky ohroženého druhu ČR. Topol černý jako původní druh v nížinných povodích řek ČR, vyžadující plné oslunění a plnění meliorační funkce, se vyznačuje vhodnými vlastnostmi průkopní dřeviny pro lokality přirozených luhů (SVOBODA 1957). Při pěstování přípravných porostů lze předpokládat, že porosty s vyšší genetickou variabilitou budou lépe odolávat nepříznivým podmínkám životního prostředí, které se v posledních letech vlivem prudkých výkyvů počasí a dlouhých period sucha na většině stanovišť zhoršují. Dalším ekonomickým aspektem je přínos v částečné náhradě produkce dřeva cennějších hospodářských dřevin, jejichž porosty jsou postiženy hromadným hynutím v důsledku kalamitního výskytu škůdců. Při výběru morfologicky i geneticky kvalitních výchozích jedinců pro účely obnovy lesa z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mýtní zralosti porostů bude dosaženo vyšší kvantitativní (objemové) produkce, což přispívá ke zvýšení konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů.

Využívání metodických postupů umožňujících získání geneticky ověřených druhově potvrzených, variabilních, a tedy adaptabilnějších porostů topolu černého je přínosné i z hlediska celospolečenského a napomáhá k zajištění ekologické stability krajiny, k zachování stromového patra při obnově lužních lesů, k ochraně proti erozi lesní půdy a k vytváření ochranných pásů. Současně dochází i k naplňování cílů Národního programu – podporovat kvalitní genetické zdroje a ověřovat jejich identitu metodou DNA markerů.

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 129 Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 16 lokusů přibližně 360 Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2024 a je nutné zmínit, že cena chemikálií se stále 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. Při využití služeb komerčních laboratoří je možné se obrátit například na společnost 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 u topolu černého pro ověřování druhové čistoty, zjišťování úrovně diverzity například při výběru vhodných druhově ověřených jedinců pro jejich uznání za zdroje reprodukčního materiálu a pro klonovou determinaci totožných klonů. Uvedené postupy DNA analýz klonové identifikace jsou využitelné pro kontrolní mechanismy uživatele např. ve směsích klonů nebo při reprodukci klonů potřebných vlastností. 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 vyšší ekonomický přínos z těžby dřeva u vlastníků lesů ze zvýšených budoucích výnosů z porostů založených z kvalitních ověřených zdrojů reprodukčního materiálu.

VI DEDIKACE

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0123.

VII SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- CIFTCI A., KARATAY H., KÜCÜKOSMANOĞLU F., KARAHAN A., KAYA Z. 2017. Genetic differentiation between clone collections and natural populations of European black poplar (*Populus nigra* L.) in Turkey. *Tree Genetics and Genomes*, 13: 69.
- ČÍŽKOVÁ L., BARNET P., MÁCHOVÁ P. 2018. Využití topolu šedého jako náhrady jasanu a olše při obnově zejména lužních lesů. *Lesnický průvodce*, 3: 27 s.
- ČÍŽKOVÁ L., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2020. Možnosti využití domácích druhů rodu *Populus* v lesnické praxi. *Lesnický průvodce*, 2: 33 s.
- ČORTAN D., SCHROEDER H., ŠIJAČIĆ-NIKOLIĆ M., WEHENKEL CH., FLADUNG M. 2016. Genetic structure of remnant black poplar (*Populus nigra* L.) populations along biggest rivers in Serbia assessed by SSR markers. *Silvae Genetica*, 65-1: 12-19.
- 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.
- FOSSATI T., GRASSI F., SALA F., CASTIGLIONE S. S. 2003. Molecular analysis of natural populations of *Populus nigra* L. intermingled with cultivated hybrids. *Molecular Ecology*, 12: 2033–2043. Doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01885.x
- HEINZE B. 2008. Genetic traces of cultivated hybrid poplars in the offspring of native *Populus nigra* in Austria. *Preslia*, 80: 365–374.
- HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1990. Květena České republiky 2. Praha, Academia: 540 s.
- HRČKA D. 2016. Červený seznam ohrožených druhů rostlin České republiky. Chráněné a ohrožené druhy cévnatých rostlin České republiky [online]. Salvia-Ekologický institut z. s. Dostupné na: <https://salvia-os.cz/chrane-ne-ohrozene-druhy/>
- 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.

- 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.
- KHASA D., NADEEM S., THOMAS B., ROBERTSON A., BOUSQUET J. 2003. Application of SSR markers for parentage analysis of *Populus* clones. *Forest Genetics*, 10(4): 273–281.
- KHASA D., POLLEFEYS P., NAVARRO-QUEZADA A., PERINET P., BOUSQUET J. 2005. Species-specific microsatellite markers to monitor gene flow between exotic poplars and their natural relatives in eastern North America. *Molecular Ecology Notes*, 5: 920–923. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01114.x
- 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.
- LIESEBACH H., SCHNECK V., EWALD E. 2010. Clonal fingerprinting in the genus *Populus* L. by nuclear microsatellite loci regarding differences between sections, species and hybrids. *Tree Genetics and Genomes*, 6: 259–269.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283–392.
- 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.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945–959.
- RATHMACHER G., NIGGEMANN M., WYPUKOL H., GEBHARDT K., ZIEGENHAGEN B., BIALOZYT R. 2009. Allelic ladders and reference genotypes for a rigorous standardization of poplar microsatellite data. *Trees*, 23: 573–583.
- RATHMACHER G., NIGGERMANN M., KÖHNEN M., ZIEGENHAGEN B., BIALOZYT Z. 2010. Short-distance gene flow in *Populus nigra* L. accounts for small-scale spatial genetic structures: implications for in situ conservation measures. *Conservation Genetics*, 11: 1327–1338.
- 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 reimplementa-tion of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- SMULDERS M. J. M., VAN DER SCHOOT J., ARENS P., VOSMAN B. 2001. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.). *Molecular Ecology Notes*, 1: 188–190.
- SMULDERS M. J. M., BERINGEN R., VOLOSYANCHUK R., VANDEN BROECK A., VAN DER SCHOOT J., ARENS P., VOSMAN B. 2008a. Natural hybridisation between *Populus nigra* L. and *P. x canadensis* Moench. Hybrid offspring competes for niches along the Rhine river in the Netherlands. *Tree Genetics and Genomes*, 4: 663–675. Doi:10.1007/s11295-008-0141-5
- SMULDERS M. J. M., COTTRELL J. E., LEFÈVRE F., VAN DER SCHOOT J., ARENS P., VOSMAN B., TABBENER H. E., GRASSI F. et al. 2008b. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.10.063>
- SVOBODA P. 1957. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část III. Praha, Státní zemědělské nakladatelství.
- TRÖBER U., WOLF H. 2015. Erhaltung der Schwarz-Pappel (*Populus nigra* L.) in Sachsen: Erfassung, Charakterisierung und Vermehrung auf genetischer Grundlage. *Forstarchiv*, 86: 166–173. Doi:10.4432/0300-4112-86-166
- ULUĞ A. 2022. Detection and confirmation of diagnostic microsatellite loci in *Populus nigra* and *Populus deltoides* to identify their hybrids (*P. x canadensis*). *Turkish Journal of Botany*, 46: 603–613. Doi:10.55730/1300-008X.2735
- VAN DER SCHOOT J., POSPÍŠKOVÁ M., VOSMAN B., SMULDERS M. J. M. 2000. Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theor Appl Genet* 101: 317–322.
- 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.
- WÓJKIEWICZ B., LEWANDOWSKI A., ŻUKOWSKA W. B., LITKOWIEC M., WACHOWIAK W. 2021. Low effective population size and high spatial genetic structure of black poplar populations from Oder valley in Poland. *Annals of Forest Science*, 78: 37. Doi: 10.1007/s13595-021-01055-2

VIII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2015. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 8: 36 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P. 2016. Genetická charakterizace jedle bělokoré pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 5: 34 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2016. Studium variability populací buku lesního pomocí mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 8: 35 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., POLÁKOVÁ L., TRČKOVÁ O. 2017. Evaluation of the genetic diversity of selected *Fagus sylvatica* L. populations in the Czech Republic using nuclear microsatellites. Journal of Forest Science, 63: 53–61.
- 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.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. 2019. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u lípy srdčité (*Tilia cordata* Mill.) certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 36 s.
- 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. Lesnický průvodce, 3: 36 s.
- 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. Lesnický průvodce, 4: 32 s.
- 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. Lesnický průvodce, 8: 22 s.
- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., VÍTOVÁ K. 2023. Stanovení genetické diverzity u jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.) na základě molekulárních analýz. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 36 s.

- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. 2014. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého (Evaluation of Norway spruce seed orchard using microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 59 (4): 243–249.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O., ŽIŽKOVÁ E. 2017. Využití mikrosatelitových markerů pro ověřování klonové identity u třešně ptačí. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 10: 40 s.

METHODOLOGICAL PROCEDURES FOR SPECIES DETERMINATION AND FOR CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY IN BLACK POPLAR (*POPULUS NIGRA* L.) BASED ON GENETIC ANALYZES USING MICROSATELLITE MARKERS

Summary

The impacts of climate change on forestry in the Czech Republic have caused mass dieback of forest stands in recent years, including floodplain forests, where alder and ash stands have declined significantly due to fungal pathogens (Čížková et al. 2018). Black poplar as pioneer deciduous trees with amelioration function is a suitable substitute tree for the lower altitudes of riparian ecosystems, but its stands have been reduced strongly in the past by human activities and hybrid poplar trees (*Populus ×canadensis*) were often planted instead. To face climate change, there is an increasing interest to restore the riparian habitats of European rivers (SMULDERS et al. 2008b), using wood species suitable for floodplain forest ecosystems. For wider use in forestry, it is essential to ensure a sufficient amount of quality sources of reproductive material. Verification of genetic characteristics of remaining black poplar stands is possible on the basis of DNA analysis using microsatellite markers. Diagnostic microsatellite markers (WPMS09, WPMS18, PMGC14, PMGC2163, PMGC456) were proved suitable for species determination and distinguishment of black poplar trees from hybrid combinations. *Populus ×canadensis* produced by crossing of *Populus nigra* and *Populus deltoides* is potential mating partner for *Populus nigra* (RATHMACHER et al. 2010). Identifying pure black poplar using morphological traits alone is very difficult due to the frequent occurrence of intermediate and variable forms in nature. Selected polymorphic nuclear microsatellite markers (WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS19, WPMS21, WPMS22) proved suitable for finding the genetic parameters for verifying the levels of genetic diversity between different genotypes and for determination of clonal identity in case of vegetative reproduction of black poplar trees. Information on the nucleotide sequences of the primers and the sizes of the microsatellite amplification products is shown in Table 1.

The selected trees of black poplar from localities of Moravia and Bohemia were used to develop this methodology. In addition, 14 samples of *Populus deltoides* and

10 hybrids of *Populus ×canadensis* (obtained by controlled crosses between *Populus deltoides* Bartr. and *Populus nigra* L.) cultivated in the gene bank of the FGMRI were used as reference samples to detect the eventual occurrence of introgression in the monitored poplar trees based on species-specific alleles for *P. deltoides* in diagnostic microsatellite markers.

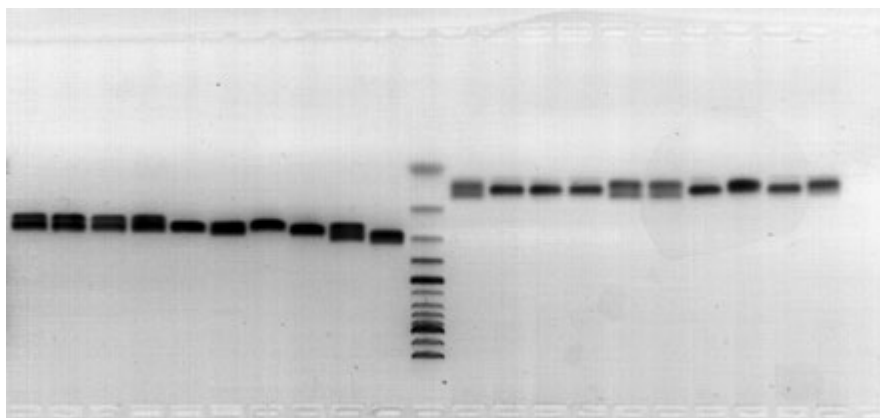
Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR) are small repetitive DNA sequences, highly variable markers and commonly used in population genetic for many forest tree species including black poplar (FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008a, 2008b, RATHMACHER et al. 2010, TRÖBER, WOLF 2015, ČORTAN et al. 2016, CIFTCI et al. 2017, WÓJKIEWICZ et al. 2021). SSR are codominant markers and therefore can distinguish homozygotes and heterozygotes. Black poplar with two sets of chromosomes is diploid organism, so each locus has two alleles. This methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), (Table 2–7), separation, sizing of amplification products (Table 8) and calculations of molecular data (Table 9–11). Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from 100 mg fresh young leaves or 20 mg lyophilized ones. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser. Genetic data (allele sizes) for investigated individuals of poplar trees were obtained using GeneMapper® 4.1 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The presented methodological procedures for DNA analyses to determine the level of genetic diversity of black poplar, to identify genetically identical individuals and for species determination of black poplar will contribute to the improvement of the reproductive material of black poplar and to the conservation of genetic resources of this endangered tree species, which is included in the category of critically endangered species in the Red List of Endangered Plant Species of the Czech Republic (HRČKA 2016).

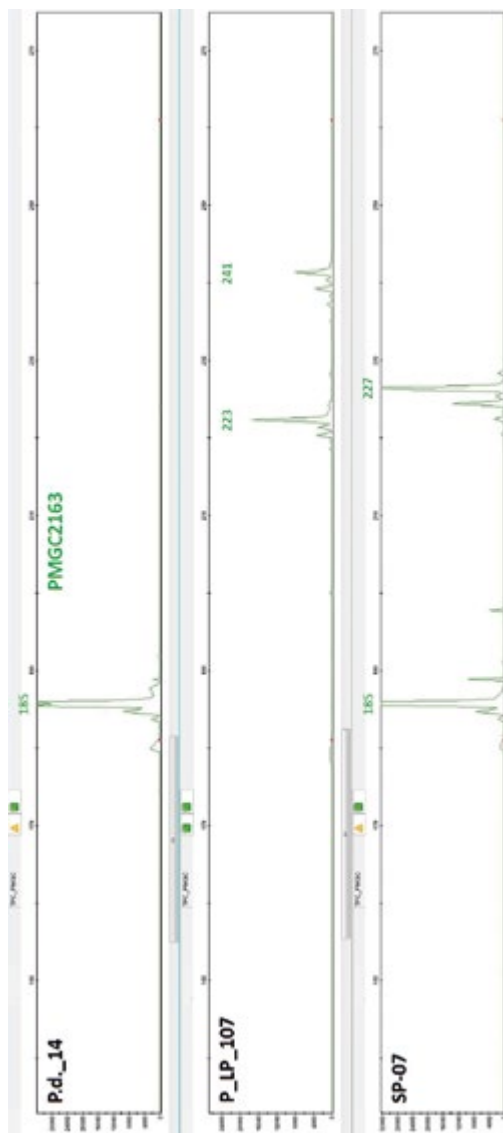
The knowledge obtained from genetic investigation using presented microsatellite markers will serve for the needs of the coordinator of the National Programme for the protection and reproduction of the gene pool of forest tree species (The Forest Management Institute) and subsidy policy of the Czech Republic. They will be used further in the state administration in the field of preservation genetic resources of forest trees and can be used in the amendment of forestry legislation. The genetically polymorphic and morphologically quality trees are using for *ex situ* conservation strategies in the field gene bank of the FGMRI.

PŘÍLOHA

Příklady výstupů genetických analýz



Obr. 2: Ukázka elektroforetického záznamu amplifikačních produktů testovaných markerů WPMS14 a WPMS16



Obr. 3: Ukázky výstupů fragmentačních analýz z genetického analyzátoru u amplifikátů diagnostického markeru PMGC2163 pro jedince topolu bavlníkového (referenční vzorek P.d._14, hodnota alely 185 v homozygotní formě), určeného topolu černého (vzorek P_LP_107, v heterozygotní formě alely 223 a 241) a topolu kanadského (referenční vzorek SP-07, v heterozygotní formě alely 185 a 227)



Obr. 4: Ilustrační foto – topol černý, Libický luh



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 2/2024