

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

<http://www.vulhm.cz>

**Metodické postupy ověřování genetické diverzity a klonové identity u břízy bělokoré
(*Betula pendula* Roth) s využitím mikrosatelitových markerů**

Helena Cvrčková (40 %), Pavlína Máchová (30 %), Olga Trčková (30 %)

Adresa autorů:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., Ing. Olga Trčková,

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

Email: cvrckova@vulhm.cz, machova@vulhm.cz, trckova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-219-9

Obsah:

I. Cíl metodiky

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

2. Metodické postupy

2.1. *Odběr vzorků a postupy izolace DNA*

2.2. *Postupy PCR amplifikace*

2.3. *Postupy elektroforézy v agarózovém gelu*

2.4. *Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů*

2.5. *Zpracování molekulárních dat*

III. Srovnání novosti postupů

IV. Popis uplatnění metodiky

V. Ekonomické aspekty

VI. Dedikace

VII. Seznam použité související literatury

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Summary

Abstract

The aim of this methodology is to present the use of DNA analyses by nuclear microsatellite markers for determination the clonal identity and receiving of genetic characteristics in species silver birch. 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 silver birch were used to develop this methodology. Twelve selected polymorphic nuclear microsatellite markers proved suitable for finding the genetic parameters for verifying the clonal identity and levels of genetic diversity between different genotypes. Using the presented methodology of DNA analysis, it will be possible to verify the genetic parameters of phenotypically high-quality individuals and to select suitable clones ensuring sufficient diversity for the establishment of propagation stands, such as the seed orchard.

Keywords: silver birch; DNA analysis; microsatellite markers; clonal identification; genetic diversity

Použité zkratky v textu:

DNA - deoxyribonukleová kyselina

nSSR - nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR - Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR - Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

Oponenti: Ing. Alžběta Pařízková, ÚHÚL, Brandýs n. L., pobočka Hradec Králové

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

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je představit postupy DNA analýz pro objektivní určování identity klonů a sledování úrovně genetické diverzity u břízy bělokoré s využitím polymorfních mikrosatelitových markerů. Bříza bělokorá s pionýrskou strategií růstu by se měla v širším měřítku uplatňovat při obnově velkoplošných kalamitních holin. Za tímto účelem je třeba vyhledat vhodné zdroje reprodukčního materiálu. U fenotypově kvalitních jedinců bude možné představenými postupy DNA analýz ověřit jejich genetickou kvalitu a provést výběr vhodných klonů s dostatečnou diverzitou pro založení množitelských porostů např. semenného sadu.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Do rodu bříza (*Betula* L.) je zařazeno přibližně 120 druhů stromů a keřů rostoucích převážně na severní polokouli (HEJNÝ et SLAVÍK 1990). Pro lesnictví i životní prostředí Česka je významným zástupcem tohoto rodu bříza bělokorá (*Betula pendula* Roth.), která obsazuje obnažené plochy a plní funkci primárního zalesnění, protože vyžaduje plný osvit. Dorůstá do středně velkých rozměrů až 30 m výšky s průměrem kmene kolem 70 cm. Z hlediska pohlaví je to dřevina jednodomá, jejíž plody jsou lehounké nažky s lemem bez endospermu daleko se šířící větrem. Břízy jich vytváří téměř každoročně obrovské množství a plodit začínají brzy, na volném prostranství již i od 10 let. Bříza bělokorá přirozeně zaujímá rozsáhlý euroasijský areál a v Česku roste po celém území od nížin s výjimkou lužních lesů až po horské oblasti do výšky kolem 1000 m. Je to typická průkopní dřevina, která se v lesnictví používá k zalesňování holin po devastovaných lesích. Tento světlomilný druh s malou výmladkovou schopností v zástínu brzy odumírá. Je součástí lesních společenství, zvláště acidofilních doubrav, písčinych borů, roste na silikátových skalách, osidluje paseky, haldy, výsypky a ladem ležící plochy, na kterých

často vytváří spontánní monokultury. Je schopná růst i na extrémních stanovištích s nedostatkem půdní vláhy nebo naopak v menší míře i s nadbytečnou vlhkostí, přizpůsobí se nejrozličnějším půdním podkladům, ale převažuje na kyselých horninách, písčitých půdách s vysokým obsahem skeletu nebo i na skalách. Není náročná ani na klimatické podmínky a snáší i znečištěné ovzduší. Březové dřevo je roztroušeně pórovité bez jádra s lehce narůžovělým odstínem. Využívá se k výrobě překližek a dýh pro nábytkářství a jako výborné palivo. Užitek již od pradávna přinášejí i březová míza, kůra a listy v léčení a kosmetice. Bříza je i důležitá parková okrasná dřevina (HEJNÝ et SLAVÍK 1990, ÚRADNÍČEK et al. 2009).

V posledních letech docházelo k velkoplošným rozpadům hospodářského lesa, především smrkových porostů z důvodu nadměrně vysokých teplot, silného sucha a následného zničení oslabených stromů lýkožroutem smrkovým. Pro zalesňování rozsáhlých holin se výzkumně ověřují efektivní postupy obnovy s využitím vhodných alternativních druhů dřevin. Světломilná bříza bělokorá, která není náročná na environmentální podmínky a přináší i hospodářský užitek, je vhodným druhem dřeviny pro výchozí zalesňování holin. Ve vzrůstu, utváření borky, tvaru a velikosti listů, ale i stavbě dřeva je variabilní (HEJNÝ et SLAVÍK 1990). Pro využití v lesnictví je podstatné zajistit dostatečné množství kvalitních zdrojů reprodukčního materiálu. Vedle posouzení kvality na základě morfologických znaků lze s využitím DNA analýz získat i genetické charakteristiky. Při zakládání semenných sadů nebo směsí klonů je vhodné ověřit genetickou diverzitu vybraných zdrojových stromů a pro kontrolu správnosti objektivně zhodnotit identitu deklarovaných klonů. Pro genetická studia jsou vhodné vysoce polymorfní mikrosatelitové markery (Simple Sequence Repeats- SSR), jejichž postupy analýz tato metodika podrobně popisuje. Využití mikrosatelitových markerů pro genetická studia bylo již popsáno u řady druhů lesních dřevin (SCHUELER et al. 2003, VORNAM et al. 2004, MAGHULY et al. 2006, UNGER et al. 2011, WAGNER et al. 2012, Pluess et al. 2013, MÁCHOVÁ et al. 2018, DI PIETRO et al. 2020) včetně břízy bělokoré (KULJU et al. 2004, TSUDA et al. 2017).

Mikrosatelity představují krátké repetice nejčastěji 2 – 4 báze dlouhých nukleotidových motivů, které se u jednotlivců liší jejich počtem, tedy délkou lokusů. Pro zhodnocení jejich délky, která se nejčastěji pohybuje mezi 100 – 300 bázemi, je nutné vzhledem k velikosti celého genomu, který u břízy bělokoré představuje 440 mil. bází (SALOJÄRVI 2017), získat jejich mnohonásobné kopie. Mikrosatelitové lokusy jsou amplifikovány 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. Tyto reakce probíhají v teplotních cyklech za účelem rozdělení DNA dvoušroubovic na jednotlivá vlákna (při teplotě kolem 94 °C), nasednutí primerů na specifická místa (většinou mezi 50 – 60 °C) a tvorbu nových cílených dvouřetězcových úseků (nejčastěji 72 °C). Opakováním těchto cyklů exponenciálně přibývají kopie specifického úseku DNA – mikrosatelitového lokusu. Postupy PCR je nutné zoptimalizovat, abychom získávali jednoznačné a reprodukovatelné PCR produkty. Jejich přesné velikosti, získané pomocí fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru, se statisticky zpracovávají pro získání genetických charakteristik sledovaných dřevin. Specifické jaderné SSR markery mají kodominantní charakter, což umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů.

Jaderné polymorfní mikrosatelitové markery lze tedy vedle sledování diverzity populací také využít pro ověřování klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu například v semenných sadech, směsích klonů atd. Genetické otestování deklarovaného původu reprodukčního materiálu na základě jejich přiřazování k referenčním vzorkům umožňuje objektivním postupem potvrdit nebo vyvrátit klonovou identitu ramet. Aplikace nových kontrolních metod ověřování klonové identity reprodukčních zdrojů na základě DNA analýz se již využívá státní správou při realizaci dotační politiky v oblasti podpory zachování a reprodukce genofondu některých lesních dřevin.

2. Metodický postup

2.1. Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Nejvhodnějším termínem odběru rostlinného materiálu u břízy bělokoré pro získání kvalitní DNA je brzké 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 vyizolované 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. Při manipulaci 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, zmraženého 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 je vzduchotěsně uzavřít (např. lze použít plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Lyofilizovaný materiál lze skladovat při pokojové teplotě a snadněji se s ním manipuluje před homogenizací, protože odpadá nutnost držet vzorky na ledu. 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 koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívat na 65 °C. V případě výskytu sraženin v pufrách AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

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

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg, rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přenesení do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 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 (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 otáček za minutu (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 1,5 násobku 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 protékající 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. Vzorke DNA skladujeme při - 20 °C, pro dlouhodobé uchování při - 80. °C

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladící blok na mikroskopické mikrozkušavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, třecí misky a tloučky, sada pipet a příslušné sterilní špičky, sterilní mikroskopické Eppendorf 1,5ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. U vyizolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/ μ l a čistotu na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm spektrofotometrem na mikroobjemy. Hodnoty pro optimální čistotu by se měly pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších nežádoucích látek (např. proteinů, fenolických látek). Vzorke DNA s koncentrací nad 50 ng/ μ l je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrém.

2.2. Postupy PCR amplifikace

1. Pro sledování rozdílů v genomech břízy bělokoré byly zvoleny analýzy jaderných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR). Po provedeném testování postupů PCR amplifikace u vzorků 30 elitních stromů ze středočeské lokality bylo vybráno 12 mikrosatelitových lokusů L1.10, L2.3, L3.4, L4.4, L5.1, L5.4, L5.5, L7.3, L13.1 (KULJU K. K. M. et al. 2004), Bo.F394, Bo.F330 (TRUONG et al. 2004), EE595358 (YOSHIKI et al. 2009), jejichž sekvence primerů byly uvedeny v publikacích. Byly optimalizovány koncentrace reakčních směsí příslušných chemických komponent a teplotní

cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) pro získání jednoznačných a velikostně příslušných amplifikátů zvolených lokusů. Optimalizované postupy PCR amplifikace s 12 vybranými markery byly seskupeny do čtyř multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů a shodnosti reakčních podmínek, aby z důvodu časových a finančních úspor mohly probíhat analýzy minimálně dvou a více markerů najednou. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce. DNA polymerázu musíme neustále uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dáváme ji do reakční směsi až nakonec přímo z mrazicího boxu.

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

Lokusy	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
L1.10	F: ACGCTTTCTTGATGTCAGCC R: TCACCAAGTTCCTGGTGGAT	168—220
L2.3	F: CAGTGTTTGGACGGTGAGAA R: CGGGTGAAGTAGACGGA ACT	168—228
L3.4	F: AACCTCGTTTGGCTACTGA R: GAACAGTTACTAGTCAA ACTGAAA ACC	240—278
L4.4	F: TTGAGATAGACGATAGAGGTAAAGCA R: AGGCATTTCTCCAATTTTCTT	235—295
L5.1	F: TCATATTAGGGGAAATATGAGAACTC R: GTAGTGGACGGAAGCTCTGG	286—306
L5.4	F: AAGGGCACCTGCAGATTAGA R: AAAATTGCAACAAAACGTGC	230—270
L5.5	F: GAGGAAGTCTCAGCTGACGTG R: TCCTTTTCAGTTTCTGATTTCTG	121—146

L7.3	F: GGGGATCCAGTAAGCGGTAT R: CACACGAGAGATAGAGTAACGGAA	178—226
L13.1	F: CACCACCACAACCACCATTA R: AACACCCTTTGCAACAATGA	70—120
EE595358	F: AGGGGATCCAATTCACAGATACA R: GTTTCGATCGAATTTGAATCCGAAGAAG	126—160
Bo.F330	F: TGGCAGCACGAAAGT R: TGGGAATGAGAGAACAAG	164—210
Bo.F394	F: AATGCAGCATCTCTTACC R: CACGCAATAATATGGAAA	119—194

Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

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

L1.10 F – 2 μ M (PET), L1.10 R – 2 μ M

L4.4 F – 2 μ M (VIC), L4.4 R – 2 μ M

L5.1 F – 4 μ M (NED), L5.1 R – 4 μ M

L5.5 F – 4 μ M (6FAM), L5.5 R – 4 μ M

Ředění primerů:

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.

Forward (F) i revers (R) primery 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 zásobního roztoku primerů L1.10 F – 2 µl, L1.10 R – 2 µl, L4.4 F – 2 µl, L4.4 R – 2 µl, L5.1 F – 4 µl, L5.1 R – 4 µl, L5.5 F – 4 µl, L5.5 R – 4 µl a doplníme 76 µl TE pufru).

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

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
10 × PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50 mM MgCl ₂	0,6 µl
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,1 µl
Primer mix	0,75 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,975 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(reagencie Polymerase Platinum Taq, 10 × PCR Buffer minus Mg, 50 mM MgCl₂, jsou dodány výrobcem společně s polymerázou Platinum Taq)

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
35 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	57 °C	45 sec	Annealing (nasednutí primerů)
4.	72 °C	55 sec	Elongace (prodlužování řetězce)
1×			
5.	72 °C	15 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

L2.3 F – 1 μM (PET), L2.3 R – 1 μM

L3.4 F – 2 μM (NED), L3.4 R – 2 μM

L7.3 F – 2 μM (VIC), L7.3 R – 2 μM

EE595358 F – 2 μM (6FAM), EE595358 R – 2 μM

Ředění primerů:

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

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů L2.3 F – 1 μl, L2.3

R – 1 μ l, L3.4 F – 2 μ l, L3.4 R – 2 μ l, L7.3 F – 2 μ l, L7.3 R – 2 μ l, EE595358 F – 2 μ l, EE595358 R – 2 μ l a doplníme 86 μ l TE pufru).

Reakční směs a teplotní režim PCR jsou stejné jako u multiplexu 1.

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

L5.4 F – 2 μ M (NED), L5.4 R – 2 μ M

L13.1 F – 2 μ M (6FAM), L 13.1 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 L5.4 F – 2 μ l, L5.4 R – 2 μ l, L13.1 F – 2 μ l, L13.1 R – 2 μ l a doplníme 92 μ l TE pufru).

Reakční směs je stejná jako u multiplexu 1.

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
35 \times opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace
3.	55 °C	45 sec	Annealing

4.	72 °C	55 sec	Elongace
1×			
5.	72 °C	15 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

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

Bo.F330 F – 2 μM (VIC), Bo.F330 R – 2 μM

Bo.F394 F – 2 μM (NED), Bo.F394 R – 2 μM

Ředění primerů:

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

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μl, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů Bo.F330 F – 2 μl, Bo.F330 R – 2 μl, Bo.F394 F – 2 μl, Bo.F394 R – 2 μl a doplníme 92 μl TE pufru).

Reakční směs je stejná jako u multiplexu 1.

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	94 °C	5 min	Počáteční denaturace
35 × opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	45 sec	Denaturace

3.	50 °C	45 sec	Annealing
4.	72 °C	55 sec	Elongace
1×			
5.	72 °C	15 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikrozkuřavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladicí box na PCR mikrozkuřavky, chladicí 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, 10,000X in Water, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1:10 000 a po promíchání nalít do formy. Do tekutého gelu se ihned vloží hřebínky s vhodným počtem jamek dle počtu testovaných vzorků. Ztuhlý gel se opatrně přemístí do vany pro elektroforézu, vyjmou se hřebínky a přilije se 0,5 x 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 L5.4 je uveden v příloze.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

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

2.4. Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Zjištění přesné velikostí amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5' konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET) a PCR amplifikáty musí být před fragmentační analýzou následujícím způsobem denaturovány na jednovláknové fragmenty. Nejprve se PCR produkty jednotlivých vzorků napipetují po 1 µl do 96 jamkových destiček určených pro analyzátor a pak se ke každému vzorku přidá 11 µl směsi připravené z Formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ® Size

standard v 2.0, Applied Biosystem). Směs se připravuje v objemech 11 μ l Formamidu a 0,4 μ l velikostního standardu na jeden vzorek a pomocí vortexu se krátce promíchá. Po napipetování směsi k amplifikátům se destička krátce stočí na centrifuze, aby byl roztok u dna jamky, a pak se destička inkubuje 4 minuty při teplotě 94° C, následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i 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 z hlediska velikosti alel a fluorescenčního zbarvení primerů.

Fluorescenčně zbarvené amplifikáty 12 vybraných markerů získané pro jedince břízy bělokoré podle uvedených metodických postupů lze seskupit pro fragmentační analýzy do 3 běhů. První běh zahrnuje amplifikované lokusy multiplexu 1 (L1.10, L4.4, L5.1, L5.5). Do 96 jamkových destiček určených pro analyzátor se nanáší po 1 μ l z PCR směsi amplifikovaných lokusů 1. multiplexu a ke každému vzorku se přidá 11 μ l směsi připravené z Formamidu a velikostního standardu. V druhém běhu probíhá stejným postupem fragmentační analýza PCR produktů multiplexu 2 (amplifikované lokusy L2.3, L3.4, L7.3, EE595358) a v 3. běhu se sloučí produkty multiplexu 3 (L5.4, L13.1) a multiplexu 4 (Bo.F330, Bo.F394). Z třetího a čtvrtého multiplexu se napipetuje do jamek po 1 μ l, takže v každé jamce budou 2 μ l směsi amplifikátů. Přidá se o 1 μ l méně směsi Formamidu a velikostního standardu a to 10 μ l, z důvodu nastavení kapilár genetického analyzátoru na daný objem roztoku v jamkách.

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

je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a sterilní špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, 96 jamkové destičky příslušné k analyzátoru, genetický analyzátor

e. Zpracování molekulárních dat

Jaderné mikrosatelitové markery jsou specifické úseky DNA s kodominantním charakterem, v případě diploidního organismu jako je i bříza bělokorá 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.

Pro získání genetických charakteristik a zjištění klonově identických jedinců se velikosti alel hodnocených lokusů statisticky zpracovávají, např. za využití statistických programů GenAlEx 6.5 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012), CERVUS (KALINOWSKI et al. 2007), GENEPOP 4.2 (RAYMOND et ROUSSET 1995; ROUSSET 2008), STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). 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 u porostů břízy bělokoré hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a frekvence alel, genetické diferenciacce mezi populacemi, hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, odvození populačních struktur apod. Jedna z nejvýznamnějších genetických charakteristik je ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které 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). Výsledkem je zpracovaná genotypizace - přehled hodnot

alel sledovaných lokusů - pro šetřené klony. Příslušnost jedince ke klonu je deklarovaná, když jsou shodné hodnoty alel u všech analyzovaných lokusů. V případě použití vysoce polymorfních markerů lze počet sledovaných markerů snížit a tím snížit i náklady na analýzy. Někteří autoři např. SCHUELER et al. (2003), LACIS et al. (2009, 2011) uvádějí ve svých publikacích využití jen tří až sedmi vysoce polymorfních markerů.

III. Srovnání novosti postupů

Metodické postupy DNA analýz u břízy bělokoré pro sledování genetické variability a klonové identity s využitím jaderných mikrosatelitových markerů nebyly dosud pro podmínky České republiky popsány. Na základě genetického šetření lze vybrané stromy břízy bělokoré využít pro získání kvalitnějšího reprodukčního materiálu, se kterým se dosáhne efektivnějšího zalesnění holin s dostatečnou variabilitou porostů a ověřeným výběrem elitních klonů. Významnost nových postupů v předkládané metodice spočívá ve využití DNA analýz pro objektivní ověření příslušnosti ramet (jedinců) k určitému ortetu (klonu) a sledování genetické diverzity mezi jedinci a porosty. V případě založení semenného sadu s klony břízy bělokoré, lze vedle dokumentační evidence zdrojů reprodukčního materiálu, kdy ale případnou záměnu klonů v sadu nelze vyloučit, objektivně potvrdit deklarovanou identitu jedinců k příslušným klonům na základě uvedených metodických postupů analýz mikrosatelitových markerů. Objektivní genetické hodnocení spočívá v přímé analýze DNA jedinců s využitím polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů, jejichž velikosti jsou s přesností jednotek bází zaznamenávány na genetickém analyzátoru. Z důvodu ekonomických i časových úspor při zpracování většího počtu vzorků jsou metodické postupy analýz mikrosatelitových markerů optimalizovány i z hlediska jejich seskupení do multiplexů. Výstupem analýz je multilokusová genotypizace (MLG), což představuje databázi velikostí alel hodnocených lokusů k jednotlivým stromům. Na základě této databáze se posuzuje klonová příslušnost jedince ke

klonu i genetická diverzita mezi klony. Pro získání informací o genetické variabilitě břízy bělokoré bylo potřebné zvolit DNA markery, které vykazují vysokou míru polymorfismu. Mezi nejvariabilnější oblasti genomu patří mikrosatelitové lokusy, které se liší v počtu opakování základního sekvenčního motivu nukleotidových bází. S využitím genetického analyzátoru získáme přesné rozlišení alel, kdy lze zjistit i rozdílnou velikost amplifikačních produktů lišících se pouze o jednu repetici motivu (u dinukleotidových motivů jen o 2 báze). Za účelem ověření klonální identity a zjišťování genetických charakteristik u břízy bělokoré bylo pro DNA analýzy vybráno 12 jaderných mikrosatelitových markerů L1.10, L2.3, L3.4, L4.4, L5.1, L5.4, L5.5, L7.3, L13.1 (KULJU K. K. M. et al. 2004), Bo.F394, Bo.F330 (TRUONG et al. 2004), EE595358 (YOSHIKI et al. 2009), jejichž postupy PCR amplifikace byly optimalizovány i za účelem možnosti jejich seskupení do multiplexů. Amplifikace a navazující fragmentační analýzy provedené v multiplexech představují velkou časovou a finanční úsporu. Popsané metodické postupy byly odzkoušeny u vyhledaných morfologicky kvalitních jedinců břízy bělokoré z oblasti středních Čech.

IV. Popis uplatnění metodiky

Uplatnění metodiky bude spočívat v získávání poznatků o úrovni genetické diverzity zájmových porostů břízy bělokoré za účelem výběru vhodných zdrojů reprodukčního materiálu a v ověření deklarované identity klonů u všech typů klonových výsadeb (semenných sadů a směsí klonů).

V současné zvýšené potřebě zalesňovat kalamitní holiny nabývá bříza bělokorá jako jeden z druhů přípravné dřeviny na významu a pro tyto účely je žádoucí, aby se používaly morfologicky kvalitní a geneticky variabilní břízy. Popsané metodické postupy ověření identity klonů/ortetů u semenných sadů (popř. směsí klonů) s břízou bělokorou budou sloužit

pro potřeby státní správy a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (ÚHÚL) při aplikaci nových kontrolních metod a dotační politiky České republiky. U nově uznávaného semenného sadu s břízou bělokorou bude pro naplňování dotačního titulu na základě předkládaných metodických postupů DNA analýz probíhat výběrová kontrola genetické totožnosti roubovanců rostoucích v semenném sadu s referenčním materiálem rostlinných vzorků odebraných ze zdrojových rodičovských stromů ve stejnou dobu, kdy byly odebírány rouby pro napěstování roubovanců. Referenční vzorky se odebírají za přítomnosti zástupce ÚHÚL a uchovávají se v ultra nízkých teplotách (-80 °C).

Předložené metodické postupy jsou návodem pro získání znalostí o úrovni genetické diverzity, diferenciaci, heterozygotnosti a dalších genetických charakteristikách u zdrojových porostů reprodukčního materiálu, které jsou při umělé obnově lesa velmi důležité. Při vyšší úrovni genetické diverzity lze předpokládat zvýšenou adaptační schopnost k nepříznivým podmínkám prostředí a tím zachování stability lesních ekosystémů. Předpokládá se, že informace o genetických charakteristikách porostů budou využity jako podklady pro rozhodovací řízení, strategické plánování a legislativní činnost státní správy v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem. Další možné aplikační využití získaných poznatků je při uznávání zdrojů reprodukčního materiálu a jejich zařazování do Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin včetně zařazování vzorků z těchto zdrojů do Národní banky osiva a explantátů lesních dřevin, kdy lze především na základě míry genetické diverzity rozhodnout, které populace (porosty) je možné zařadit jako cenné zdroje. Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí 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 břízy bělokoré a příklady výstupů DNA analýz jsou uvedeny v příloze.

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

V. Ekonomické aspekty

Po mnoha desetiletí až století bylo dřevo hlavních hospodářských druhů lesních dřevin běžně dostupné. V současné době vlivem kalamitních úhynů se stává nedostatkovým produktem, který z důvodu dlouhověkosti těchto druhů dřevin bude v případě příznivých klimatických podmínek obnoven až za několik desítek let. Určité nahrazení výpadku dřeva by mohly poskytnout rychlerostoucí dřeviny jako jsou i břízy bělokore při výběru morfologicky i geneticky kvalitních výchozích stromů. Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že v době mytní zralosti porostů bude dosaženo vyšší kvantitativní (objemové) produkce, což přispívá ke zvýšení ekonomické životaschopnosti a konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů. Bříza bělokora byla považována za důležitou pionýrskou a meliorační dřevinu, ale s omezeným využitím a nízkým zhodnocením dřeva (REISNER et ZEIDLER 2010). Přitom tato dřevina nacházela široké uplatnění již v dávné minulosti např. na výrobu lepidla, nádob, v nábytkářství, kosmetice, v lékařství a jako výborné palivo. Dřevo břízy bělokore je roztroušeně pórovité a bez jádra (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Barva je bělavá, popřípadě se žlutým nádechem. Kresba dřeva je málo výrazná, ale vyskytují se formy s výraznou a dekorativní kresbou jako je například karelská (finská) bříza. Je to dřevina polotvrdá s dobrými mechanickými vlastnostmi dřeva, které lze využít pro mnohá technická zpracování, ale výrobky z břízy jsou vhodné jen pro vnitřní prostředí, v exteriéru je dřevo náchylné k napadení dřevokaznými houbami. Dřevo břízy se v širokém měřítku zpracovává v severoevropských státech a v Rusku. Rozvinutý překližkárenský průmysl je například ve Finsku. Velkým dodavatelem dýhovaného, překližkového a masivního březového nábytku je od 80. let minulého století švédská firma IKEA (REISNER et ZEIDLER 2010). V Čechách je

nedostatek kvalitního březového dřeva pro technické zpracování a většina domácí břízy se zpracovává na palivo. Pro výrobu nábytku a dalších produktů se dýhy a překližky dováží např. z Polska, Ruska, Ukrajiny (Dřevospektrum, Rakovník).

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k poznatkům o genetické kvalitě zdrojů reprodukčního materiálu břízy bělokore je i přínos celospolečenský. Při použití dostatečně geneticky variabilního výchozího materiálu pro zalesňování se získají stabilnější a odolnější porosty, které budou zvyšovat biologickou rozmanitost, lépe se přizpůsobovat možným změnám klimatu a tím přispívat k ochraně životního prostředí. 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 118,- Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 12 lokusů přibližně 212,- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2021 a je nutné zmínit, že cena chemikálií se postupně navyšuje. V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. 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 u břízy bělokore pro klonovou identifikaci a zjišťování úrovně diverzity porostů. Tyto postupy jsou využitelné pro kontrolní mechanismy uživatele při ověřování identity klonů. Poznatky dále podpoří genově bohatší porosty, které jsou stabilnější a odolnější k možným chorobám a škůdcům a změnám klimatu. Také lze předpokládat zvýšený ekonomický přínos

z těžby dřeva u vlastníků lesů ze zvýšených budoucích výnosů z porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu.

VI. Dedikace

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a výzkumného projektu NAZV č. QK1920328 (Komplexní řešení obnovy a pěstování lesa v oblastech s rychlým velkoplošným hynutím lesa).

VII. Seznam použité související literatury

DI PIETRO R., DI MARZIO P., ANTONECCHIA G., CONTE A. L., FORTINI P. 2020. Preliminary characterization of the *Quercus pubescens* complex in southern Italy using molecular markers. *Acta Botanica Croatia*, 79 (1): 15–25.

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.

HEJNÝ S., SLAVÍK B. (eds.) 1990: Květena České republiky 2. Praha, Academia: 540 s.

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.

KULJU K. K. M., PEKKINEN M., VARVIO S. 2004. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 471–473.

LACIS G., RASHAL I., RUISA S., TRAJKOVSKI V., IEZZONI A. F. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collection by using SSR (microsatellite) markers. *Scientia Horticulturae*, 121: 451–457.

LACIS G., RASHAL I., TRAJKOVSKI V. 2011. Implementation of a limited set of SSR markers for screening of genetic variability in Latvian and Swedish sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genetic resources collections. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 65 (1/2): (672/673): 21–28. DOI: 10.2478/v100046-011-0014-4

MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., CVRČKOVÁ H. 2018. Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity of selected populations of *Picea abies* (L.) Karsten in the Czech Republic. *Forests*, 9 (92): 1–15. doi:10.3390/f9020092.

- MAGHULY F., PINSKER W., PRAZNIK W., FLUCH S. 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L). Karst.]. *Forest Ecology and Management*, 222: 266–271.
- 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. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pluess A. R., Määttänen K. 2013. Characterization of eighteen novel microsatellite markers and multiplex PCR protocol for *Fagus sylvatica*. *Conservation Genetics Resources*, 5: 311–314.
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 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.
- REISNER J., ZEIDLER A. 2010. Možnosti využití dřeva břízy. *Lesnická práce*, 89 (12): 30–31.
- ROUSSET F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.

SALOJÄRVI J., SMOLANDER O. P., NIEMINEN K. et al. 2017. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch. *Nature Genetics* 49: 904–912. <https://doi.org/10.1038/ng.3862>

SCHUELER S., TUSCH A., SCHUSTER M., ZIEGENHAGEN B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome*, 46: 95–102.

TSUDA Y., SEMERIKOV V., SEBASTIANI F., VENDRAMIN G. G., LASCoux M. 2017. Multispecies genetic structure and hybridization in the *Betula* genus across Eurasia. *Molecular Ecology*, 26: 589–605.

TRUONG C., PALMÉ A. E., FELBER F., NACIRI-GRAVEN Y. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 96–98.

UNGER G. M., KONRAD H., GEBUREK T. 2011. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution*, 292: 133–141.

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.

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

WAGNER S., GERBER S., PETIT R. J. 2012. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch). *Molecular ecology resources*, 12 (4): 717–725.
Doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03139.x

YOSHIKI T., SANEYOSHI U., YUJI I., YOSHIHIKO T. 2009. Development of 14 EST-SSRs for *Betula maximowicziana* and their applicability to related species. *Conservation Genetics*, 10, 661–664.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

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.

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. 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. Hodnocení genetických charakteristik u borovice lesní s využitím mikrosatelitových markerů. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce, 4: 43 s.

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.

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.

Methodological procedures for verification of genetic diversity and clonal identity in silver birch (*Betula pendula* Roth) using microsatellite markers

Summary

The Silver birch is a deciduous tree species of the family Betulaceae, native to Europe and parts of Asia, found throughout the northern hemisphere. It has been introduced into North America and in the southern parts of its range, it is mainly found in mountainous regions. It is a pioneer species that needs plenty of light, one of the first trees to appear on bare land or after a forest fire. It is able to grow even in extreme habitats with a lack of soil moisture or, conversely, to a lesser extent with excess moisture, adapts to various soil substrates, but predominates on acidic rocks, sandy soils with a high skeleton content or even on rocks. Its tolerance to pollution make it suitable for planting in industrial areas and exposed sites. The silver birch is a medium-sized deciduous tree with the white peeling bark on the trunk, which grows up to 30 m (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Tiny monoecious (male and female) flowers appear in early spring in separate catkins on the same tree. The numerous small winged seeds are spread widely by the wind. The silver birch is used for different products, various parts of the tree are used in traditional medicine and cosmetics. It is planted decoratively in parks and gardens. The Silver birch wood is pale in colour with no distinct heartwood and quality forms of trees are used in making furniture, plywood, veneers, parquet blocks, skis, and kitchen utensils, and in turnery. It makes a good firewood, but is quickly consumed by the flames (HEJNÝ et SLAVÍK 1990, ÚRADNÍČEK et al. 2009, REISNER et ZEIDLER 2010). For use in forestry, it is essential to ensure a sufficient amount of quality sources of reproductive material. Verification of genetic characteristics is possible on the basis of DNA. Mentioned methodological procedures of DNA analyses using nuclear microsatellite markers can be used to gain objective knowledge about clonal identity, genetic diversity, and the structure of gene sources in reproductive material. Knowledge of the level of genetic diversity is important for assessing the resistance of populations to environmental changes or diseases. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSR) are small repetitive DNA sequences, highly variable markers and commonly used in population genetic. SSR are codominant markers and therefore can distinguish homozygotes and heterozygotes. The silver birch with two sets of chromosomes is diploid organism. The selected individuals of silver birch were used to develop this methodology, that describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of polymerase chain reaction (PCR), separation, sizing of amplification products and calculations

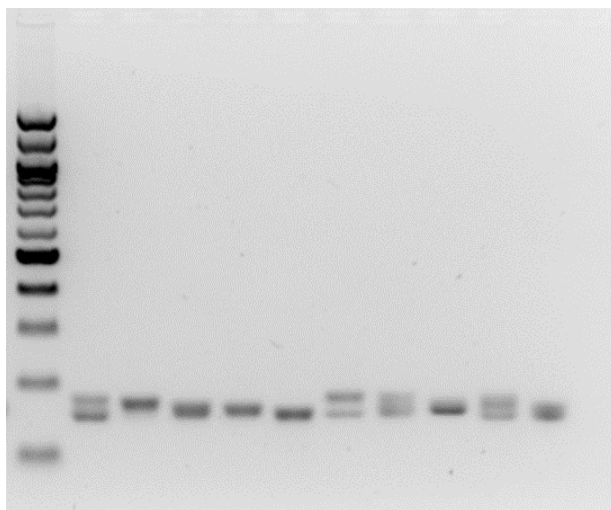
of molecular data. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from 100 mg fresh young leaves or 20 mg lyophilized ones. The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Based on a previous screening twelve variable microsatellite markers L1.10, L2.3, L3.4, L4.4, L5.1, L5.4, L5.5, L7.3, L13.1 (KULJU K. K. M. et al. 2004), Bo.F394, Bo.F330 (TRUONG et al. 2004), EE595358 (YOSHIKI et al.(2009) were selected for DNA analysis (Table 1). PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser.

The developed procedures of DNA analyses for objective determination of the genetic diversity and the clonal identity of gene sources of reproductive material will contribute to the quality of the silver birch reproductive material for primary afforestation of clearings and to creating optimal forest composition in order to maintain the ecological stability. The knowledge obtained from genetic monitoring will be used in the state administration in the field of protection and reproduction of genetic resources of forest trees and can be used in the amendment of forestry legislation. The procedures of this methodology for verifying the genetic identity of clones for seed orchards or mixtures of clones and diversity of gene sources 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) for the application of new control methods, selection of genetic sources and subsidy policy of the Czech Republic.

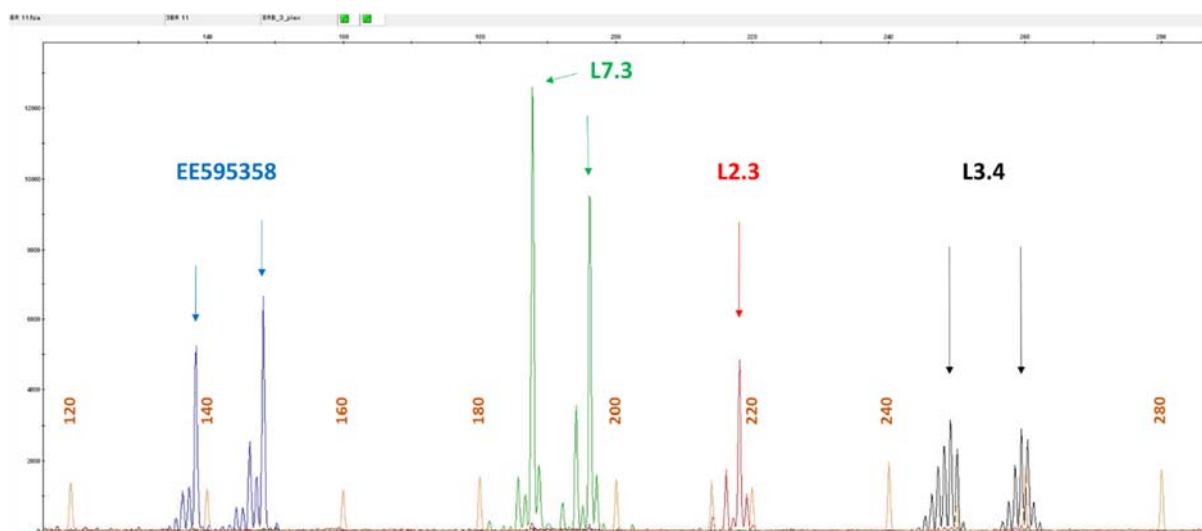
Příloha

Příklady výstupů genetických analýz u břízy bělokoré

Obr. 1: Ukázka elektroforetického záznamu amplifikačních produktů testovaného markeru L5.4



Obr. 2: Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru pro jeden klon břízy bělokoré u čtyř mikrosatelitových markerů



Tab. 1.

Příklad multilokusové genotypizace (MLG) u vybraných jedinců břízy bělokoré

označení klonu	Bo.F330		Bo.F394		L5.4		L13.1		L1.10		L4.4	
BR 01	179	189	134	144	241	255	87	103	209	209	262	262
BR 02	197	197	136	142	237	237	103	103	177	193	252	252
BR 03	195	199	138	140	241	241	97	103	177	193	266	266
BR 04	179	179	134	154	241	255	91	97	177	179	268	268
BR 05	179	179	132	138	239	241	97	103	177	177	250	250
BR 06	179	179	138	150	245	253	95	99	183	199	252	260
BR 07	177	195	134	138	237	237	87	101	203	213	270	270
BR 08	189	197	132	132	237	241	93	95	177	183	252	252
BR 09	195	199	136	138	245	255	97	103	171	177	250	250
BR 10	179	187	138	168	245	255	87	93	185	201	248	248

označení klonu	L5.1		L5.5		L2.3		L3.4		L7.3		EE595358	
BR 01	301	301	128	140	174	196	265	265	194	196	138	138
BR 02	301	331	140	140	196	218	261	263	196	196	138	148
BR 03	301	311	134	140	196	196	261	271	188	196	130	138
BR 04	301	301	130	138	208	208	259	263	196	196	138	138
BR 05	301	301	118	128	196	196	265	265	198	198	148	148
BR 06	301	301	130	130	212	212	247	261	188	198	152	152
BR 07	301	323	118	128	196	196	261	261	198	198	130	142
BR 08	301	311	128	128	196	208	259	267	188	196	136	136
BR 09	301	301	140	140	196	196	261	271	196	198	138	142
BR 10	301	301	136	136	196	218	261	261	196	198	138	142