

**Metodické postupy charakterizace genetické diverzity u topolu černého
(*Populus nigra* L.) s využitím mikrosatelitových markerů**

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

<http://www.vulhm.cz>

Helena Cvrčková, Luďka Čížková, Pavlína Máchová, Kateřina Vítová

Adresa autorů:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Luďka Čížková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.,
Bc. Kateřina Vítová,

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

Strnady 136, Jíloviště 252 02

Email: cvrckova@vulhm.cz, ludka.cizkova@seznam.cz, machova@vulhm.cz,
vitova@vulhm.cz

Oponenti:

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

Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D., Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v
Olomouci a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Šlechtitelů 27, Olomouc-Holice
783 71

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 monitoring the genetic variability and for determination the clonal identity in species black poplar. 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. Eleven selected polymorphic nuclear microsatellite markers with a more balanced frequency of represented allele sizes 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. This species is pioneer deciduous trees with amelioration function and can be used as one of the alternative for reforestation of the lower altitudes. Black poplar 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 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.

Keywords: black poplar; DNA analysis; microsatellite markers; genetic diversity; clonal identification

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)

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je představit postupy DNA analýz s využitím polymorfních mikrosatelitových markerů pro sledování úrovně genetické diverzity a zjišťování klonové identity u topolu černého jako vhodného alternativního druhu dřeviny při znovuzalesňování poloh s nižší nadmořskou výškou 1. – 2. LVS. Za tímto účelem se vyhledávají 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.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Topol černý (*Populus nigra* L.) z čeledi vrbovítých (*Salicaceae*) je mohutný strom 30 – 40 m vysoký, s průměrem kmene 1 – 2 m, na jehož bázi se vytvářejí výrazné kořenové náběhy. K jeho vyšší vitalitě přispívá, že vytváří jak hluboké kořeny jdoucí za spodní vodou, tak i kořeny do široka rozprostřené blízko půdního povrchu, přesahující značně obvod koruny. Topol černý vyniká vysokou výmladnou schopností na kmeni i na pařezu a lze jej snadno množit řízkováním. Je to dvoudomý strom s převislými samičími nebo samčími jehnědami. Zpočátku vysokou klíčivost velkého množství ochmýřených semen rychle ztrácí. Je náročný na dostatek světla a ani v mládí nesnáší zastínění. Na území ČR je původním druhem s převážným zastoupením v lužních lesích u velkých řek a jejich přítoků. Je to rychlerostoucí dřevina, jejíž dřevo se užívalo v truhlářství, bednářství, řezbářství a na palivo. Významné uplatnění nachází při výsadbách stromořadí vytvářejících ochranné pásy a jako krajnotvorný prvek (HEJNÝ, SLAVÍK 1990; ÚRADNÍČEK et al. 2009). V minulosti byl lidskou činností značně redukován a

nahrazován ekonomicky atraktivnějšími druhy dřevin a produktivnějšími kultivary topolu kanadského (BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2016).

V posledních letech vlivem extrémních výkyvů počasí a dlouhodobých period sucha dochází k destrukci lužních lesů a hromadnému odumírání pěstovaných jasanů a olší působením houbových patogenů (ČÍŽKOVÁ et al. 2018). Pro udržení ekologické stability krajiny, zachování vegetačního pokryvu, kvality vod, omezení degradace a eroze lesní půdy a zmírnění propadu produkce dřeva se ověřují efektivní postupy obnovy lesa s využitím vhodných alternativních druhů dřevin, ke kterým se řadí i topol černý. Snáší plný osvit, plní meliorační funkce a jeho dřevo lze využít pro některá technická zpracování a na palivo. Na přirozených stanovištích se zachovaly pouze zbytkové porosty nebo jen jedinci na lokalitách ve středním Polabí, Poohří, v moravských úvalech, v povodí Odry, Ostravice a Morávky (BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2016). Pro opětovné rozšíření topolů a jeho využití v obnově lesa a krajiny je potřebné získávat kvalitní zdroje reprodukčního materiálu. V terénu se vyhledávají na základě morfologických znaků fenotypově kvalitní stromy, u kterých se s využitím DNA analýz zjišťují genetické charakteristiky. Zjišťování genetické struktury vybraných stromů je významné při jejich navržení k uznání zdrojů reprodukčního materiálu pro možnost vyloučení blízce příbuzných a zejména identických genotypů, které mohou vzniknout vzhledem k velmi dobré kořenové výmladnosti topolu černého (SVOBODA 1957). Získání dostatečně geneticky variabilního potomstva je podstatné pro adaptační schopnost budoucích porostů v měnících se podmínkách životního prostředí (SMULDERS et al. 2008a). Při zakládání semenných sadů nebo směsí klonů je vhodné ověřit genetickou diverzitu vybraných zdrojových jedinců (rodičů rodiny). DNA analýzy lze dále využít u založených směsí klonů a semenných sadů pro následnou objektivní kontrolu správné identity deklarovaných klonů. Pro genetická studia se ověřují vhodné polymorfní mikrosatelitové markery (Simple Sequence Repeats - SSR), jejichž postupy analýz tato metodika podrobně popisuje. Využití mikrosatelitů jako DNA markerů 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, PLUETT, MÄÄTTÄNEN 2013, MÁCHOVÁ et al. 2018, DI PIETRO et al. 2020) včetně topolu černého (FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008b, WÓJKIEWICZ et al. 2021).

Mikrosatelity představují krátké repetice nejčastěji složené ze 2 – 4 bází nukleotidových motivů, které se u jednotlivců liší jejich počtem, tedy délkou mikrosatelitových lokusů. Pro vyhodnocení jejich délky, která se u většiny markerů pohybuje mezi 100 – 300 bázemi, je nutné specifické úseky v rámci celého genomu rozpoznat, což se děje jejich namnožením v mnohonásobné kopie pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). K PCR amplifikaci jsou nezbytné primery (krátké oligonukleotidy většinou dlouhé kolem 20 bází), které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem, enzym polymeráza řídící proces amplifikace, stavební jednotky nukleotidy a pufrů upravující prostředí probíhající reakce. PCR 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 dvouřetězových úseků (nejčastěji při 72 °C). Opakováním těchto cyklů exponenciálně přibývají kopie specifického úseku DNA – mikrosatelitového lokusu. Postupy PCR (koncentrace reakčních složek, teploty a časy cyklů) je nutné 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.

Topol černý se stal ohroženým druhem říčních ekosystémů i v řadě dalších evropských zemí, v kterých se pro záchranu jeho genofondu sleduje genetická diverzita zbývajících porostů pomocí analýz mikrosatelitových markerů (SMULDERS et al. 2008a,b, RATHMACHER et al. 2010, TRÖBER, WOLF 2015, ČORTAN et al. 2016, CIFTCI et al. 2017, WÓJKIEWICZ et al. 2021).

Představené metodické postupy DNA analýz umožňují u vybraných stromů topolu černého zjistit úroveň jejich genetické diverzity a navrhnout je k uznání za zdroje kvalifikovaného reprodukčního materiálu za účelem zachování stávajícího genofondu.

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. 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. 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 přenesse se do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 µl pufru AP1 a následně 4 µl RNázy A. Pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2–3 × převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 µl pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu 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 µl směsi a přemístíme do DNeasy Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. DNeasy Mini Spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.

9. Přidáme dalších 500 μl pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně DNeasy Mini Spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme DNeasy Mini Spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 μl AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu DNeasy Mini Spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm. Získáme 100 μl prvního eluátu.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu. Vzorky DNA skladujeme při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro dlouhodobé uchování při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladicí blok na mikrozukavky ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ LABTOP COOLERS), mrazicí box, třecí misky a tloučky, sada pipet a příslušné sterilní špičky, sterilní mikrozukavky Eppendorf 1,5ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. U izolované DNA lze zjistit její koncentraci v $\text{ng}/\mu\text{l}$ 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 $\text{ng}/\mu\text{l}$ je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrem.

2.2. *Postupy PCR amplifikace*

Pro zjišťování úrovně genetické diverzity stromů topolu černého a ověřování geneticky identických jedinců byly optimalizovány postupy DNA analýz s využitím jaderných mikrosatelitových markerů – nuclear simple sequence repeats (nSSR). Při vypracovávání metodických postupů bylo testováno 22 markerů. Pro optimální postupy hodnocení a získání objektivních výsledků analýz byl výběr zaměřen na mikrosatelitové markery dostatečně polymorfni a zároveň s vyrovnanější frekvencí zastoupených velikostí alel. Vybráno bylo 11 jaderných mikrosatelitových markerů: WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS19, WPMS21, WPMS22 (Tab. 1). Sekvence primerů zvolených markerů byly publikovány autory VAN DER SCHOOT et al. (2000) a SMULDERS et al. (2001). Byly optimalizovány koncentrace reakčních směsí příslušných chemických komponent (tab. 2) a teplotní cykly polymerázových řetězových reakcí (PCR) (tab. 3, 4, 5) pro získání jednoznačných a velikostně příslušných amplifikátů zvolených lokusů. Optimalizace 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 11 vybraných markerů byly sestaveny do tří multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů a shodnosti reakčních podmínek. PCR chemikálie je nutné udržovat v chladu a i přípravu reakční směsi je potřebné dělat na ledu nebo chladové destičce. DNA polymerázu musíme neustále uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pipetujeme ji do reakční směsi až nakonec jen s krátkým vyjmutím z mrazicího boxu.

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

Lokus/motiv repetice	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
WPMS01 (GA) ₂₀	F: AACCACTATGCCACCTTCTT R: AACTAACTCCATTCATTGCTAAA	111—165
WPMS04 (GT) ₂₅	F: TACACGGGTCTTTTATTCTCT R: TGCCGACATCCTGCGTTCC	231—319
WPMS07 (GT) ₂₄	F: ACTAAGGAGAATTGTTGACTAC R: TATCTGGTTTCCTCTTATGTG	221—271
WPMS10 (GT) ₂₃	F: GATGAGAAACAGTGAATAGTAAGA R: GATTCCCAACAAGCCAAGATAAAA	230—266
WPMS11 (GT) ₂₆	F: TAAAGATGATGGACTGAAAAGGTA R: TAAAGGAGAATATAAGTGACAGTT	175—227
WPMS13 (GT) ₂₂	F: GATCCTGAACAATGTCGTA CTTC R: ACGATAACCTGCGAGAAATGT	102—144
WPMS14 (CGT) ₂₈₋₃	F: CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC R: GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	228—288
WPMS16 (GTC) ₈ (ATCCTC) ₅	F: CTCGTA CTATTTCCGATGATGACC R: AGATTATTAGGTGGGCCAAGGACT	133—163
WPMS19 (CAG) ₂₈₋₃	F: AGCCACAGCAAATTCAGATGATGC R: CCTGCTGAGAAGACTGCCTTGACA	185—245
WPMS21 (GCT) ₄₅₋₁₂	F: TGCTGATGCAAAAAGATTTAG R: TTGGA ACTTCAACATTCAGAT	270—324
WPMS22 (TGA) ₂₃	F: ACATGCTACGTGTTTGG AATG R: ATCGTATGGATGTAATTGTCTTA	82—160

Protokoly polymerázové řetězové reakce (PCR):

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

WPMS01 F – 2 μ M (VIC), WPMS01 R – 2 μ M

WPMS04 F – 2 μ M (PET), WPMS04 R – 2 μ M

WPMS11 F – 3 μ M (NED), WPMS11 R – 3 μ M

WPMS13 F – 1 μ M (6FAM), WPMS13 R – 1 μ M

WPMS19 F – 1 μ M (6FAM), WPMS19 R – 1 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 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 × PCR Buffer, minus Mg	1,5 µl
50 mM MgCl ₂	0,6 µl
10 mM dNTPs (2,5 mM each)	0,2 µl
Primer mix	0,75 µl
Polymerase Platinum Taq	0,075 µl
H ₂ O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich)	10,875 µl
Přidat 1 µl templátové DNA	

(chemikálie Polymerase Platinum Taq, 10 × 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 × 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×			
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

WPMS22 F – 2 μ M (6FAM), WPMS16 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, WPMS22 F – 2 μ l, WPMS22 R – 2 μ l a doplníme 84 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 \times 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):

WPMS14 F – 1 μ M (NED), WPMS14 R – 1 μ M

WPMS21 F – 2 μ M (6FAM), 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 WPMS14 F – 1 μ l, WPMS14 R – 1 μ l, WPMS21 F – 2 μ l, WPMS21 R – 2 μ l a doplníme 94 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
4.	72 °C	105 sec	Elongace
1×			
5.	72 °C	10 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a sterilní špičky, mikrozkuhavky (stripy, destičky PCR s víčky), chladicí box na PCR mikrozkuhavky, 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 mikrovlnou 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 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 WPMS11 je uveden v příloze (obr. 1).

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). 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 μ l do 96 jamkových destiček určených pro analyzátor (např. MicroAmp 96 Well Reaction Plate od ABI Applied Biosystem), pak se ke každému vzorku přidá 11 μ l 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 se roztok stáhl ke dnu jamky, a pak se destička inkubuje 4 minuty při teplotě 94° C, následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut.

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

Amplifikáty 11 markerů u každého šetřeného jedince topolu černého byly získány ve třech seskupeních (multiplexech). Fragmentační analýzy podle multiplexů probíhají 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, WPMS22) a ve třetím běhu multiplexu 3 (WPMS14 a WPMS21). Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru pro jedince topolu

černého u multiplexu 1 je uvedena v příloze (obr. 2). Po provedené denaturaci se destička vkládá do genetického analyzátoru.

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, 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 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.

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, 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 topolu černého hodnotit a porovnávat úroveň genetické diverzity, alelické varianty a 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. Zhodnocení genetické příbuznosti probíhá s využitím statistického programu (např. GenAlEx 6.5) párovým porovnáním získaných multilokusových genotypů u šetřených stromů. Pro optimální vypovídací hodnotu při sledování identity nebo diverzity topolů černých byl výběr mikrosatelitových markerů zaměřen na markery dostatečně polymorfnní a zároveň s vyrovnanější frekvencí zastoupených velikostí alel.

III. Srovnání novosti postupů

Popis metodických postupů DNA analýz s využitím mikrosatelitových markerů pro ověřování genetické variability u topolu černého nebyl dosud pro podmínky ČR publikován. Za účelem sledování genetické diverzity u topolů černých vyhledávaných v terénu podle morfologických znaků bylo vybráno 11 jaderných mikrosatelitových markerů: WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS19, WPMS21, WPMS22 (VAN DER SCHOOT et al. 2000, SMULDERS et al. 2001), jejichž optimalizované postupy DNA analýz jsou v metodice podrobně uvedeny a velikosti jejich alel byly získány fragmentační analýzou na genetickém analyzátoru Applied Biosystem 3500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Pro získání informací o genetické variabilitě topolu černého 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. Pro sledování diverzity mezi jedinci bylo cílem získat soubor

otestovaných markerů, které jednotlivé topoly po genetické stránce dobře odliší. Markery byly vybrány na základě hodnot jejich genetických charakteristik získaných po provedených analýzách u souboru 239 topolů černých z moravských a českých lokalit. Pro optimální vypovídací hodnotu studia diverzity mezi jedinci byl výběr zaměřen na mikrosatelity nejen dostatečně polymorfní, ale i s vyrovnanější frekvencí zastoupených alel (obr. 3 – příloha). Výsledkem fragmentačních analýz je vypracovaná databáze, kterou představují u šetřených jedinců velikosti alel k jednotlivým lokusům (tab. 2 - příloha.). Po statistickém zpracování genetických veličin získáme zhodnocení genetické příbuznosti mezi topoly a informaci o identických genotypech v případě vegetativně namnožených stromů. 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. Významnost uvedených metodických postupů spočívá v objektivním ověřování klonové totožnosti a sledování genetické diverzity mezi jedinci a porosty přímou analýzou DNA, jejíž struktura (sekvence nukleotidů) je nezávislá na změnách podmínek prostředí. 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. DNA analýzy 11 vybraných markerů byly optimalizovány do tří multiplexů podle velikostí amplifikovaných lokusů a shodnosti reakčních podmínek jejich PCR amplifikace.

IV. Popis uplatnění metodiky

Předložené metodické postupy jsou návodem pro získání znalostí o velikostech a frekvencích alel, úrovni heterozygotnosti a dalších charakteristikách genetické diverzity přímým studiem genomu u topolu černého za účelem výběru dostatečně variabilních zdrojů reprodukčního materiálu pro získání geneticky různorodých porostů při umělé obnově lesa. Zjišťování genetické struktury u fenotypově kvalitních stromů je významné při jejich navržení na uznané

zdroje reprodukčního materiálu pro ověření genetické příbuznosti a vyloučení vegetativně namnožených identických genotypů, které vznikají u topolu černého z důvodu silné výmladnosti na pařezech i kořenech (SVOBODA 1957).

Topol černý byl v minulosti lidskou činností silně redukován a za ohroženou dřevinu je považován již od poloviny 20. století (ČÍŽKOVÁ et al. 2020). V Červeném seznamu ohrožených druhů rostlin České republiky je 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 lesnický opomíjeného autochtonního druhu topolu je v současné době významné v souvislosti s hromadným odumíráním hospodářsky významných dřevin v nižších polohách, jako jsou např. jasany 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 genetické diverzity jedinců a porostů topolu černého budou sloužit pro potřeby státní správy a koordinátora Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin (ÚHÚL). Další uplatnění získaných znalostí o geneticky podmíněné proměnlivosti se předpokládá při aktualizaci souvisejících legislativních předpisů v oblasti ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin a nakládání s reprodukčním materiálem a jako podkladů pro aktualizace Oblastních plánů rozvoje lesa.

Poznatky o diverzitě populací také napomáhají plnit cíle Státní politiky životního prostředí ČR, Strategie ochrany biologické rozmanitosti ČR 2016–2025, Státní program ochrany přírody a

krajiny České republiky pro období 2020 – 2025 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 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

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích 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 se zajištěnou vysokou úrovní genetické diverzity.

Topol černý jako původní druh v nížinných povodích řek ČR, vyžadující plné oslunění a plnicí meliorační funkci 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 mytní zralosti porostů bude dosaženo vyšší kvantitativní (objemové)

produkce, což přispívá ke zvýšení konkurenceschopnosti trvale udržitelného obhospodařování lesů. Dřevo rychlerostoucího topolu černého je považováno z topolových druhů za nejcennější a skládá se z jádra a bělí, je velmi lehké, měkké, málo ohebné a dosti trvanlivé. Do věku 50 – 60 let má velký podíl zdravého dřeva, ve vyšším stáří znehodnocuje dřevo hniloba. Upotřebení dřeva je v truhlářství, řezbářství, bednářství a na palivo. Kvalitní kmeny lze využít na výrobu dřív především pro nábytkářství. I ostatní části stromu lze využívat, například kůru jako náhradu korku . (SVOBODA 1957).

Využívání metodických postupů umožňujících získání geneticky ověřených 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 118,- Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 11 lokusů přibližně 252- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2022 a je nutné zmínit, že cena chemikálií se 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 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 topolu černého pro zjišťování úrovně diverzity

například při výběru vhodných 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 zvýšený 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-RO0118 a výzkumného projektu NAZV č. QK1810258 (Návrh alternativní druhové skladby dřevin pro lesní ekosystémy se sníženou ekologickou stabilitou v důsledku fyziologického sucha).

VII. Seznam použité související literatury

BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2016. Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. Lesnický průvodce, 11: 35 s.

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.

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.

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

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. Salvia-Ekologický institut,z.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.

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.

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 reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8: 103–106.

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.

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., VOLOSZYANCHUK 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. www.elsevier.com/locate/foreco

SVOBODA P. 1957. Lesní dřeviny a jejich porosty. Část III. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

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. DOI10.4432/0300-4112-86-166

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 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.

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

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, 4:32s

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 characterization of genetic diversity in black poplar*
(*Populus nigra L.*) using microsatellite markers

Summary

The black poplar (*Populus nigra* L.) is a deciduous, massive tree 30 - 40 m tall, with a trunk diameter of 1 - 2 m from the family Salicaceae. The root system of two kinds, firstly reaching deep up to groundwater and secondly widespread near the soil surface, contributes to its higher vitality. Black poplar has a high sprouting capacity on the trunk and stump. It is a dioecious tree with either female or male overhanging catkins. Black poplar can be easily propagated by cuttings. It is demanding of enough light and does not tolerate shading even in its youth. In the Czech Republic, it is the original species with a predominance in floodplain forests near large rivers and their tributaries. It is a fast-growing tree species, its timber was used in carpentry, cooperage, carving and for fuel. The bark could be used as imported cork. It finds significant use in the planting of tree lines as protective strips and as a landscape-forming element (HEJNÝ, SLAVÍK 1990; ÚRADNÍČEK et al. 2009). Black poplar stands have been reduced strongly in the past by human activities. The impacts of climate changes on forestry in the Czech Republic have caused the mass dieback of forest stands in recent years including floodplain forests. Black poplar as pioneer deciduous trees with amelioration function is a suitable substitute tree for the lower altitudes of riparian ecosystems. For 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. Mentioned methodological procedures of DNA analyses using nuclear microsatellite markers can be used to gain objective knowledge about genetic diversity, and clonal identity of gene sources in reproductive material. Knowledge of the level of genetic diversity is important for assessing the ability of populations to adapt to changing environmental conditions (SMULDERS et al. 2008b). 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 (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) including black poplar (FOSSATI et al. 2003, SMULDERS et al. 2008a,b, 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. The selected phenotypically quality individuals of black poplars in Moravia and Bohemia 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 eleven variable microsatellite markers WPMS01, WPMS04, WPMS07, WPMS10, WPMS11, WPMS13, WPMS14, WPMS16, WPMS19, WPMS21, WPMS22 (VAN DER SCHOOT et al. 2000, SMULDERS et al. 2001) were selected for DNA analysis (Table 1). PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser.

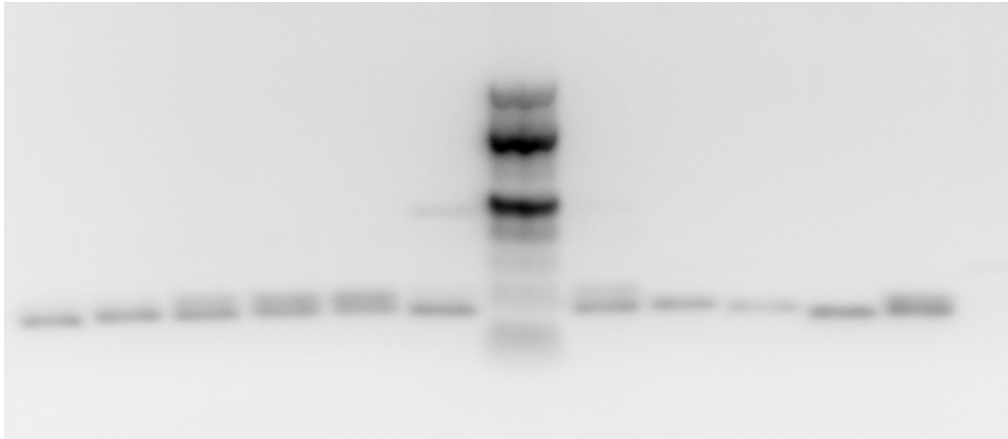
The developed procedures of DNA analyses for objective determination of the genetic diversity and the clonal identity of gene sources of reproductive material will contribute to the quality of the black poplar reproductive material for primary afforestation and to creating optimal forest composition 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. Genetically verified different individuals of the selected poplar trees could be propose in cooperation with forest owners for certification as sources of qualified reproductive material.

The procedures of this methodology for verifying the genetic identity 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. 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 u topolu černého

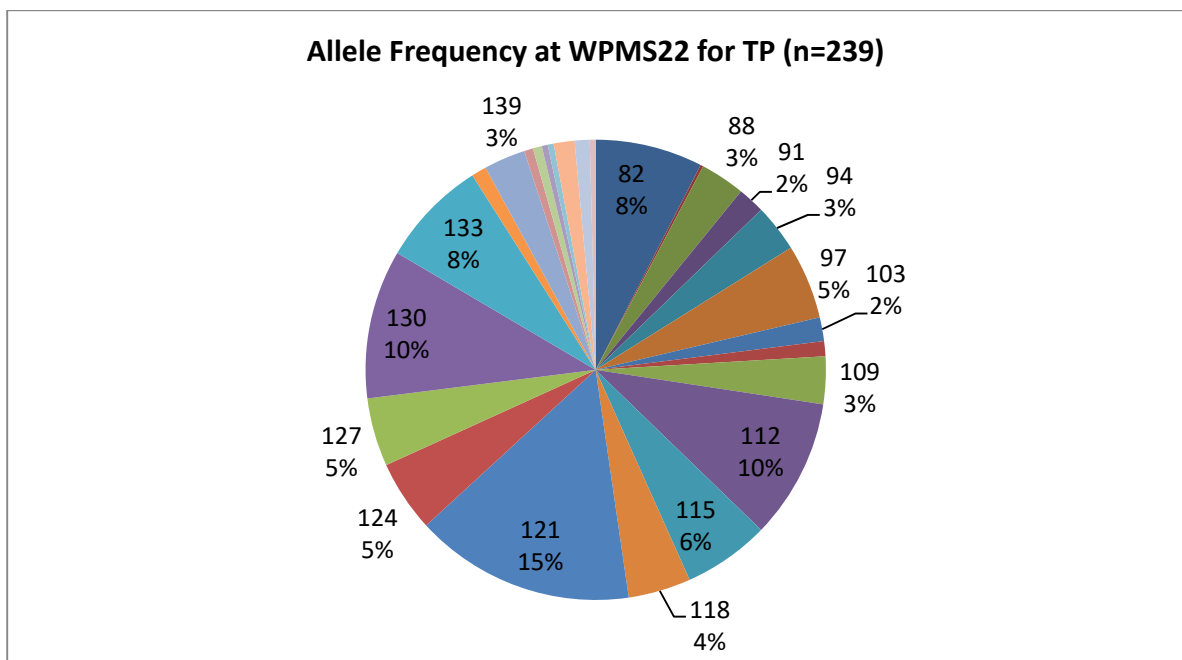
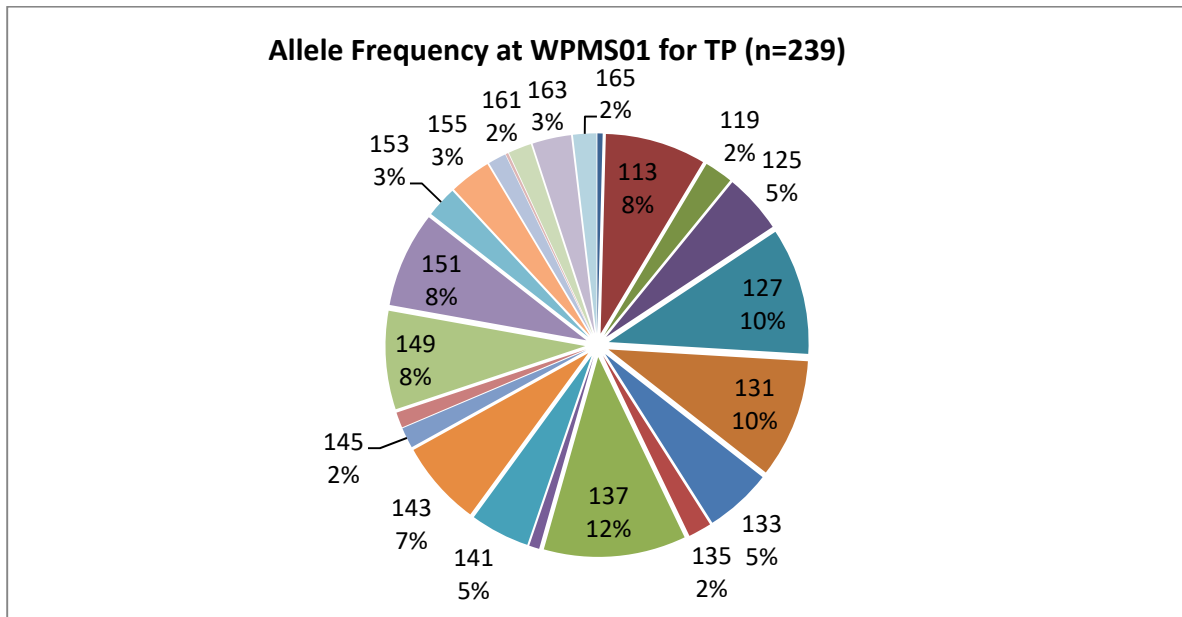
Obr. 1: Ukázka elektroforetického záznamu amplifikačních produktů testovaného markeru WPMS11



Obr. 2: Ukázka výstupu fragmentační analýzy z genetického analyzátoru pro jedince topolu černého u mikrosatelitových markerů multiplexu 1 (WPMS01, WPMS04, WPMS11, WPMS13, WPMS19)



Obr. 3 Grafické znázornění frekvencí zastoupených alel u analyzovaného souboru 239 vzorků topolu černého pro markery WPMS01 a WPMS22



Tab. 2: Příklad multilokusové genotypizace (MLG) u vybraných klonů topolu černého

Označení klonu	WPMS07		WPMS10		WPMS16		WPMS22		WPMS14		WPMS21	
P_052	239	249	244	256	136	136	121	139	228	258	300	300
P_28	259	261	236	254	136	142	121	133	228	258	291	291
P_3	261	261	232	256	142	142	124	130	228	249	285	285
P_30	237	255	236	256	136	136	112	121	228	258	300	306
P_5	261	267	242	244	136	154	103	115	228	249	282	282
P_607	237	263	236	236	136	148	109	109	228	249	282	282
P_609	255	259	236	244	136	148	148	154	258	285	294	294
P_706	259	261	236	256	136	142	88	121	228	258	291	291
P_707	245	267	236	250	136	142	139	139	228	267	303	303
P_73	237	237	250	250	142	148	112	112	231	261	312	312

klon	WPMS01		WPMS04		WPMS11		WPMS13		WPMS19	
P_052	119	137	249	317	187	217	132	136	185	224
P_28	127	145	247	255	187	223	128	132	185	215
P_3	127	127	255	291	187	187	120	128	185	206
P_30	137	143	251	291	191	219	126	130	185	185
P_5	143	161	249	255	213	219	112	126	185	206
P_607	137	153	255	289	181	181	128	138	185	206
P_609	137	137	289	301	197	219	130	134	215	245
P_706	127	137	255	275	187	217	128	132	185	215
P_707	151	151	279	305	201	201	122	134	185	224
P_73	141	149	255	255	181	213	108	136	188	236