

Ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu pomocí genetických markerů

Jiří Korecký, Zuzana Bínová, Jan Bílý, Jakub Dvořák, Dagmar Zádrapová, Filip Pastierovič,
Jaroslav Čepl, Jan Stejskal, Milan Lstibůrek

Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbát, 165 00

Dedikace

„Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu/smlouvy o dílo Grantové služby Lesů České republiky, s.p. č. 8/2016 s názvem: „Ucelený metodický postup ověřování deklarovaného původu sadovního materiálu pomocí genetických markerů.“

Jména oponentů a názvy jejich organizací

Ing. Michal Remeš
Zástupce ředitele pro obchod a genetiku
Semenářský závod Týniště nad Orlicí
Lesy České republiky, s.p.
Hradec Králové

Ing. Miroslav Válek
Ředitel pobočky Hradec Králové
Ústav pro hospodářskou úpravu lesů
Brandýs nad Labem

Obsah

Dedikace.....	1
Jména oponentů a názvy jejich organizací	1
1. Cíl metodiky.....	3
2. Vlastní popis metodiky.....	4
2.1. Úvodní rozbor tématu.....	4
2.2. Vlastní metodický postup.....	6
2.2.1. Metodika odběru vzorku.....	6
2.2.2. Izolace nukleové kyseliny	10
2.2.3. Multiplexová fragmentační analýza	11
Multiplex BK_M1 a BK_M2 pro buk lesní	13
Multiplex DBZ_M1 a DBZ_M2 pro dub zimní	15
Multiplex JD_M1 a JD_M2 pro jedli bělokorou	17
Multiplex SM_M1 a SM_M2 pro smrk ztepilý	19
2.2.4. Rekonstrukce rodokmene – určování rodičovství	21
2.2.5. Možnosti využití metodiky pro jednotlivé typy zdrojů reprodukčního materiálu (hledisko podchycení jedinců rodičovské populace).....	23
2.2.6. Stanovení hraničních hodnot rekonstrukce rodokmene.....	25
2.2.7. Modelový postup ověřování původu reprodukčního materiálu.....	26
2.2.8. Závěry a doporučení pro využití metodiky.....	29
3. Srovnání novosti postupů	30
4. Popis uplatnění metodiky	31
5. Ekonomické aspekty.....	33
6. Seznam použité související literatury	34
7. Seznam publikací, které předcházely metodice.....	36

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je vytvoření komplexního, standardizovaného a ekonomicky efektivního metodického postupu pro ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu lesních dřevin. Významným počinem v rámci metodiky je optimalizace amplifikačních multiplexů pro čtyři zájmové dřeviny definované zadavatelem projektu / uživatelem metodiky, a to smrk ztepilý, jedli bělokorou, buk lesní a dub zimní.

Pro každou dřevinu byly optimalizovány dva reakční multiplexy, které umožňují provést časově i ekonomicky efektivní genotypizaci celkově na 18 (SM, DBZ), 21 (BK) či 26 (JD) mikrosatelitových (SSRs) lokusech. V metodice je rozebrána vhodnost aplikace metodiky na jednotlivé typy zdrojů reprodukčního materiálu a na modelové situaci ilustrován celý proces ověřování deklarovaného původu od okamžiku odběru vzorku až po stanovení rozhodnutí o deklarovaném původu.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvodní rozbor tématu

V obecné rovině se porušením pravidel přenosu reprodukčního materiálu rozumí jakákoliv činnost probíhající v rozporu s příslušnými legislativními předpisy. Je pravděpodobné, že případné nelegální aktivity v oblasti přenosu reprodukčního materiálu reagují na aktuální situaci na trhu ve vztahu k dostupnosti reprodukčního materiálu a jeho aktuální potřebě. Podle různých indicií může mimo nekalých machinací s průvodní dokumentací reprodukčního materiálu na území naší republiky (např. cílená záměna průvodní dokumentace, aniž by docházelo k fyzickému transportu reprodukčního materiálu) docházet pravděpodobně také k nelegálním tokům cenově dostupnějšího osiva některých dřevin ze zahraničí (např. bukvic ze Slovenska, borovice z Polska atd.).

Současný systém kontroly je založen na souladu evidence vedené dodavateli reprodukčního materiálu a informacemi, kterými disponuje pověřená osoba. Kontrola je založena na rekonstrukci spotřebitelského řetězce, který začíná sběrem reprodukčního materiálu ze zdroje za tímto účelem uznaným, přes obchodování se všemi druhy reprodukčního materiálu až po výsadbu takového materiálu. K tomu, aby mohl být spotřebitelský řetězec rekonstruován, má pověřená osoba (ÚHÚL) k dispozici řadu oprávnění a nástrojů (např. kontrola sběru reprodukčního materiálu, vystavování potvrzení o původu, hlášení o reprodukčním materiálu atd.). Doposud však nebyl k dispozici nástroj, který by umožňoval fakticky ověřit deklarovaný původ reprodukčního materiálu na základě jeho genetických charakteristik. I když tedy v některých případech měli zástupci pověřené osoby pochybnosti o deklarovaném původu, nemohli v případě formální správnosti průvodních dokumentů toto zpochybnit. Proto je žádoucí kontrolní systém zefektivnit nasazením nástrojů molekulární genetiky. Těmito metodami lze často závěry evidenční kontroly původu reprodukčního materiálu lesních dřevin rigorózně ověřit.

Zásadním faktorem pro nasazení metodiky ověřování původu by vždy mělo být zvážení budoucího předpokládaného produkčního či/a mimoprodukčního přínosu této aktivity. Rozsáhlé studie ověřování původu nesuperiorních zdrojů reprodukčního materiálu (především porosty fenotypových tříd B a C) budou v obecné rovině neefektivní, a to vzhledem k vysokým nákladům genotypizace, značné velikosti potenciální rodičovské populace a relativně nízkému efektu předpokládaného přínosu v uchování či posunu aditivních genetických hodnot zájmových znaků při ověřeném původu reprodukčního materiálu.

Za efektivní lze považovat aplikaci metodiky na superiorní zdroje reprodukčního materiálu, kdy zajištění zdroje deklarovaného původu má značný potenciální přínos ve smyslu významného udržení či navýšení šlechtitelské hodnoty zájmového znaku či vlastnosti (produkční charakteristiky, odolnost a stabilita, lokální adaptace atd.). Reprodukční materiál superiorního charakteru má deklarovaný původ většinou v populacích omezeného rozsahu. Často jde o porosty kategorie A či o semenné sady, u kterých se počet jedinečných genotypů rodičovské populace pohybuje v řádu desítek jedinců. Toto je z pohledu praktické aplikace metodiky značná výhoda, jelikož genotypizace v rodičovských populacích je finančně i časově

přijatelná. Ověřováním reprodukčního materiálu ze superiorních zdrojů zároveň dochází ke zhodnocení dříve vynaložených investic, např. na založení a genetické testování semenného sadu, testy potomstev atd. U takových zdrojů reprodukčního materiálu je metodika navíc prakticky snadno uplatnitelná.

2.2. Vlastní metodický postup

Metodika ověřování deklarovaného původu sadebního materiálu je principiálně založena na přístupu porovnávání (komparace). Posuzuje se genetická informace filiální generace, tj. směsný vzorek jedinců (sazenic či případně přímo osiva), u kterých je požadavek na ověření deklarované příslušnosti. Posuzuje se původ zjištěné genetické informace k deklarované rodičovské populaci. Jinými slovy, dochází k rekonstrukci rodokmene (určení příbuzenských vazeb potomek – rodič). K rekonstrukci rodokmene se využívá vhodný počítačový algoritmus a ověřuje se hypotéza, že posuzovaní jedinci jsou potomky deklarované rodičovské populace. Pokud lze rekonstrukci příbuzenských vazeb považovat za úspěšnou, je deklarovaný původ potvrzen. Pokud při komparativní analýze nedojde k identifikaci vazeb rodič – potomek, je původ k deklarované zdrojové populaci vyloučen.

V případě potřeby potvrdit či vyloučit klonovou identitu (např. klony a ramety v semenných sadech, klonové výsadby, embryogenní linie propagované *in vitro*) postačuje využít pouze jeden z vytvořených multiplexů, a to díky jeho dostatečně vysoké průkaznosti, což přináší finanční úsporu oproti genotypizaci s využitím obou multiplexů. Při ověřování klonové identity nedochází k rekonstrukci příbuzenských vazeb, ale k porovnávání genetických profilů (alel) u zájmových jedinců a posuzuje se shoda či odlišnost genotypů.

V případě ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu, který vznikl generativní cestou, jsou vstupními parametry pro rekonstrukci rodokmene genotypy potomků a genotypy deklarované rodičovské populace. Pro průkazné potvrzení/vyloučení deklarovaného původu je nezbytné vždy maximalizovat úsilí o odběr vzorku pro zjištění genetického profilu u všech jedinců deklarované rodičovské populace. Optimální je situace, kdy je rodičovská populace jednoznačně vymezena, může být snadno vzorkována a analyzována (např. semenný sad). Spíše než o ovzorkování všech jedinců potenciální rodičovské populace je přesnější hovořit o podchycení skupiny všech mateřských stromů (ve smyslu donorů mateřských gametických příspěvků), jelikož vždy lze předpokládat určitou proporcii pylového toku z oblasti mimo zdroj reprodukčního materiálu (tzv. pylová kontaminace).

2.2.1. Metodika odběru vzorku

Odebírané vzorky by neměly vykazovat poškození a napadení hmyzem či houbami. Rostlinnou část pro odběr volíme podle snadnosti a rychlosti odběru, fyziologického stavu vzorku či míry poškození vzorku při odběru. Je preferován odběr asimilačních – ontogeneticky nejmladších – rostlinných pletiv (pupenů, listů, jehličí) v závislosti na dostupnosti na daném jedinci. Při odběru asimilačních orgánů zvolíme, zda budeme sbírat pupeny či listy. Pokud je to možné, preferují se pupeny – jednak odstranění krycích šupin před zpracováním vzorků zvyšuje čistotu odebraného materiálu a také jde o materiál, který na jednotku hmoty obsahuje vyšší množství DNA.

V případě nemožnosti odběru asimilačních pletiv (dospělý strom s vysoko nasazenou korunou, využití stromolezců je možné, ale značně by navýšilo náklady) se přistupuje k odběru kambia. Odebraný materiál musí reprezentovat genotyp zájmového jedince, je nutno se vyhnout

pletivům s odlišnou genetickou informací (tj. semena, plody). Avšak v případě vhodného designu studie může být DNA izolována také z pletiv semen. Například v situacích, kdy vznikne potřeba ověřit deklarovaný původ osiva ještě před vlastním výsevem. Je však třeba věnovat zvýšenou pozornost charakteristikám příslušných pletiv (haploidní gametofyt).

Odběr materiálu může probíhat celoročně, s přihlédnutím k aktuální dostupnosti konkrétního typu pletiva.

Odběr asimilačních orgánů

Při odběru asimilačních orgánů je rozhodujícím faktorem výška nasazené koruny. Pro účely molekulárně-genetické analýzy je vhodné odebrat materiál s nejmladšími buňkami, ideálně pupeny či mladé jehlice. V případě stromů, které mají vysoce nasazenou korunu, je vhodné využít teleskopické nůžky, případně jiný prostředek umožňující odběr vzorků (žebřík, lezecká souprava). Listy společně s pupeny je z jednotlivých stromů nejlepší odebírat ve formě nejmladších prýtů či celé větvičky. Pro eliminaci nutnosti opětovného odebírání v případě neúspěšné izolace DNA je vhodné odebírat minimálně 20 pupenů, 10 listů, 30 jehlic či dva zhruba 5 cm dlouhé letorosty s jehlicemi.

Odběr kambia

Kambium je odebráno z jednotlivých stromů za pomoci ocelového průbojníku, např. o průměru 14 mm (obr. 1).



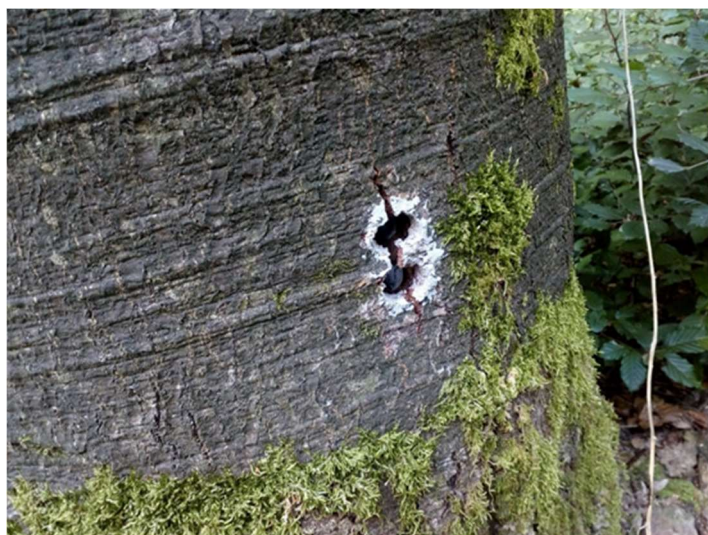
Obrázek 1 Ocelový průbojník (průměr 14 mm)

Pro účely genetických analýz je potřeba odebírat materiál s nejmladšími buňkami. Zájmový je materiál nejmladších vrstev dřeva – tedy kambiální vrstva a přilehlé nejmladší vrstvy xylému a floému (obr. 2). Průbojník se přiloží do úrovně prsní výšky (lepší okulární kontrola odběru) kolmo ke kmeni a následně se zatluče po úroveň vnějších vrstev dřeva. Tento postup zajistí odběr nejvhodnějšího materiálu – velmi tenké kambiální vrstvy. Následně je vzorek z průbojníku vytlačen přímo do uzavíratelného plastového sáčku. Z jednoho jedince je vhodné odebrat dva výseky (druhý slouží jako záložní pro potřeby opakované izolace DNA). Alternativou v případě požadavku na co nejméně viditelný odběr je provést výsek na patě kmene.



Obrázek 2 Výsek odebrané vrstvy s kambiem

Místo odběru vzorku je velmi vhodné ihned ošetřit stromovým balzámem. Takto ošetřená ranka eliminuje riziko vniku infekce či patogenu (obr. 3).



Obrázek 3 Stav stromu po jednom roce od odběru vzorku

V závislosti na konkrétním účelu lze strom také fyzicky označit, např. sprejem či identifikační destičkou.

Identifikace vzorku a možnosti uchovávání

Po odebrání vzorku je vhodné jej uzavřít do zipového uzavíratelného igelitového sáčku vhodné velikosti. Pro možnost opakování izolace DNA bez nutnosti opětovného odběru je žádoucí odebrat dostatečné množství materiálu. Spolu s odebraným materiálem se do sáčku umísťují kuličky silikagelu, a to 2-3 vrchovaté kávové lžičky (silikagel pro laboratorní účely, výrobce např. Sigma-Aldrich). Silikagel je sorbent jímající vlhkost. Silikagel může být po důkladném vysušení používán opakovaně. Za předpokladu, že bude vzorek ještě týž den uložen minimálně

do lednice, není použití silikagelu nezbytné. Ihned při odběru je nutno provést jednoznačnou identifikaci vzorku (nesmazatelný fix, či vložení štítku do pytlíku, obr. 4), aby nemohlo dojít k záměně.



Obrázek 4 Skladované vzorky odebraného kambia

Takto uložené vzorky lze převést do laboratoře při běžných teplotách s vyloučením teplotních extrémů (např. v rozpáleném automobilu), kde se ihned zpracují nebo uloží při nízké teplotě k pozdějšímu zpracování. Pro krátkodobé uchování vzorků (v řádu 1-2 dnů) postačuje uskladnění v lednici, pro střednědobé uchování (v řádu několika dní až týdnů) je vhodné vzorky skladovat v běžném mrazáku, pro dlouhodobé uchovávání vzorků (měsíce) jsou vhodné hluboko mrazicí boxy (teplota cca – 75 °C).

Alternativou pro transport a uchování vzorků je uskladnění v tekutém dusíku. Jde však o technicky náročnější a nákladnější způsob, který je obhajitelný pouze v odůvodněných případech. Například při odběru vzorku pro analýzu RNA, která velmi rychle podléhá degradačním procesům. DNA je považována za relativně stabilní a dočasně je možno vzorky uchovávat i při pokojové teplotě.

Při skladování je důležité vést jednoznačnou a nezaměnitelnou evidenci, vzorky mít řádně uzavřeny v sáčkích, aby nedošlo k jejich záměně (obr. 5).



Obrázek 5 Skladování odebraného asimilačního aparátu

2.2.2. Izolace nukleové kyseliny

Cílem izolace je získání čisté nukleové kyseliny v nativním stavu a v dostatečném množství a kvalitě. Nejprve je provedeno mechanické rozbití rostlinných pletiv vzorku vychlazeného v tekutém dusíku, a to buď tloučkem nebo pomocí oscilačního mlýnu.

Pro izolaci DNA je upřednostňováno použití komerčně dostupných izolačních kitů na bázi absorbce DNA na kolonku s obsahem křemičitých iontů. Tento postup umožňuje rychlou a efektivní izolaci DNA bez nutnosti přípravy vlastních izolačních roztoků, obecně tedy klade nižší nároky na odbornost a zkušenost laboranta.

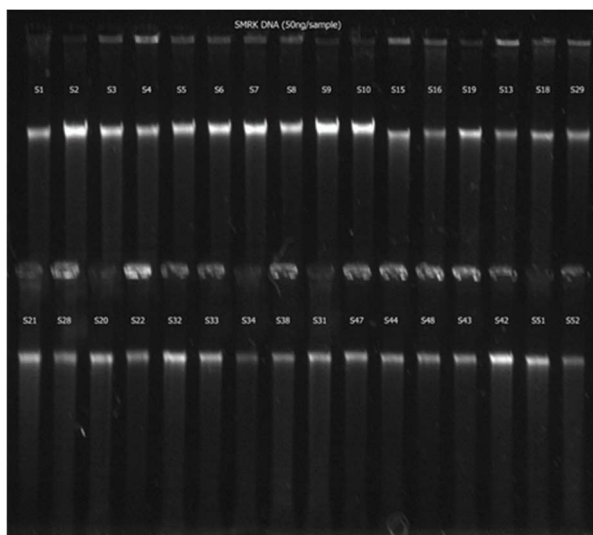
Pro zájmové dřeviny bylo testováno několik variant izolačních kitů od různých výrobců. Primárně byl testován DNeasy Plant Mini Kit od výrobce QIAGEN, který je nejrozšířenějším pro vědecké a výzkumné studie podle databáze vědeckých publikací na Web of Science. Je však třeba upozornit, že při použití tohoto kitu byly genotypizační profily identických jedinců z různého typu pletiva smrku ztepilého (pupeny versus kambiální výseky) odlišné. Ostatní dřeviny, pro které je metodika zpracována, tuto odlišnost nevykazovaly. Je proto doporučeno použití izolačního kitu Genomic DNA Mini Kit (výrobce Geneaid), který byl otestován a u všech řešených dřevin vykazoval identické genetické profily bez ohledu na charakter použitého pletiva.

Izolace se provádí dle příslušného protokolu, který je součástí izolačního kitu. Hmotnost vstupního vzorku se taktéž volí dle návodu výrobce. Lyzační fázi se doporučuje pro vyšší výtěžek DNA prodloužit na dobu 50 minut.

Ověření parametrů izolované DNA

Měření koncentrace izolované DNA je možno ověřit běžným spektrofotometrickým přístrojem (např. NanoDrop). Běžné hodnoty výtěžků se při cca 150 mg vstupního materiálu pohybují v rozmezí 15 – 100 ng/ ul roztoku DNA při celkovém elučním objemu 100 ul.

Doporučena je také kontrola kvality izolované DNA na 0,7% agarózovém gelu (obr. 6).



Obrázek 6 Ověření kvality izolované DNA na agarózovém gelu

Standardizace koncentrace

Z důvodu usnadnění dalšího pracovního postupu je třeba koncentraci DNA u všech vzorků standardizovat, a to na 20 ng/ul, přičemž dostačený objem pracovního roztoku DNA je 20 ul. Naředení na požadovanou koncentraci lze provést ultračistou vodou či elučním roztokem. Vzorky DNA s nižší koncentrací než je požadovaná se doporučuje zkoncentrovat pomocí koncentrátoru.

2.2.3. Multiplexová fragmentační analýza

Multiplexem se rozumí sdružení většího počtu mikrosatelitových primerů do jedné polymerázové řetězové reakce. Aby mohlo být toto sdružení provedeno, musí být splněna určitá kritéria, a to především 1) odlišná délka amplifikovaných fragmentů značených stejnou fluorescenční barvou, 2) primerové páry netvoří v reakční směsi dimery, 3) podobné podmínky PCR reakce – především teplota annealingu.

Protokol multiplexové amplifikace byl vyvinut za použití komerčně dostupné amplifikační směsi Type-it Microsatellite PCR kit (výrobce QIAGEN). Velkou výhodou tohoto produktu je tolerance určité odchylky od optimální teploty nasedání jednotlivých primerů, což klade nižší nároky na kritérium výběru primerů v závislosti na teplotě. Zásadním kritériem při sestavení multiplexu je maximalizace počtu polymorfních lokusů, jejichž amplifikace byla ověřována na jedincích testovací populace. Navržený multiplex je optimální pro přístroje fragmentační analýzy se čtyřmi fluorescenčními kanály pro fragmentační separaci vzorků a jedním kanálem pro velikostní standard (např. přístroj Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500).

Fragmentační analýza je prováděna s 1 ul PCR produktu s přídavkem 12,2 ul formamidu a 0,5 ul standardu (GeneScan 500 LIZ). Výstup sekvenační analýzy ve formátu fsa byl vyhodnocen programem GeneMarker (SoftGenetics LLC).

Následující tabelární přehledy představují vytvořené multiplexy pro čtyři zájmové dřeviny – buk lesní, dub zimní, jedli bělokorou a smrk ztepilý. Uvedené protokoly jsou platné pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10 mM.

Barevné označení u názvu lokusu odpovídá barvě fluorescenčního značení 5' - forward primeru (červená (PET), zelená (VIC), modrá (FAM), žlutá (NED)). Dále je uveden délkový rozsah amplikonů pozorovaný v testovací populaci, objem pracovní koncentrace primerů (je uveden objem pro jeden z primerového páru, objem druhého primeru je totožný), podmínky PCR a celkový objem reakce pro jeden vzorek.

Multiplex BK_M1 a BK_M2 pro buk lesní

Multiplex 1		Délka (bp)	Objemy	Program	Reakce	
1 ^a	concat14	170-197	0,3 ul	1x 95°C 5min	DNA	1 ul
2 ^a	EMILY	142-152	0,18 ul	95°C 45s	primery	5,16 ul
3 ^a	csolfagus_31	103-130	0,225 ul	33x 60°C 60s	H ₂ O	0,26 ul
4 ^b	mfc11	310-360	0,225 ul	72°C 60s	Type-It	6,42 ul
5 ^a	DE576	210-240	0,45 ul	1x 72°C 30min		
6 ^a	csolfagus_05	167-180	0,18 ul	1x 4°C ∞		
7 ^c	FS1-03	90-140	0,12 ul		celkem	12,84 ul
8 ^b	mfc5	270-340	0,3 ul			
9 ^a	csolfagus_19	150-185	0,12 ul			
10 ^a	csolfagus_06	200-225	0,12 ul			
11 ^d	sfc0036	90-140	0,15 ul			
12 ^b	mfc7	110-104	0,15 ul			
13 ^a	ERHBI	159-167	0,06 ul			
			2,58 ul			

Multiplex 2		Délka (bp)	Objemy	Program	Reakce	
1 ^a	EEU75	90-115	0,15 ul	1x 95°C 5min	DNA	1 ul
2 ^e	Fagsyl_002929	152-210	0,15 ul	95°C 45s	primery	1,86 ul
3 ^e	Fagsyl_003849	98-128	0,105 ul	33x 60°C 60s	H ₂ O	0,14 ul
4 ^a	DZ447	186-194	0,15 ul	72°C 60s	Type-It	3 ul
5 ^a	csolfagus_29	130-150	0,09 ul	1x 72°C 30min		
6 ^e	Fagsyl_001018	107-130	0,105 ul	1x 4°C ∞		
7 ^a	DUKCT	75-95	0,09 ul		celkem	6 ul
8 ^e	Fagsyl_003093	150-205	0,09 ul			
			0,93 ul			

Pozn. Protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Původní zdroj primerových sekvencí:

a - Lefèvre et al. 2012, b - Tanaka et al. 1999, c - Pastorelli et al. 2003, d - Asuka et al., 2004,
e - Pluess et Maattanen 2013

Primerové sekvence		
Multiplex BK_M1		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
concat14	TGAAGAAATTCACAACCCAACA	GGGTTGTTTACGATGGTGGA
EMILY	GACCCCAAGGTTACAGTGCT	CGTACAATTGCACCCACATC
csolfagus_31	TCTATTGACACAAGAATAAGAACA CC	CTTGGCAAGAAAAGGGGATT
DE576	TCTCCTTAGATCCACAATCACA	AGCTCTTCATTGCTCAGAACG
csolfagus_05	GGTTTCTAGCAAAATTGGCATT	CCCAAAAGGCCCTACTACAA
csolfagus_19	TGCCCATGAGGTTTGTATCA	GCCGAATAACCCAGAAAACA
csolfagus_06	GTTGTTGCTCACAGCAGTCG	ACGCTTGGTCTTCTTGCACT
ERHBI	TGCAACAACCTAGCACTTTGA	GCGTGTGGCTTATCCAAAAT
mfc11	ACAGATAAAAACAGAAGCCA	TTTGGTTTTGTTGAGTTTAG
mfc5	ACTGGGACAAAAAAACAAAA	GAAGGACCAAGGCACATAAA
mfc7	AAAATACACTGCCCCCAAAA	CAGGTTTTGGTTTCTTACAC
FS1-03	CACAGCTTGACACATTCCAAC	TGGTAAAGCACTTTTTCCCACT
sfc0036	CATGCTTGACTGACTGTAAGTTC	TCCAGGCCTAAAAACATTTATAG
Multiplex BK_M1 a BK_M2		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
EEU75	TTCCAAACCAACCCTTTATCC	GACGGAGATTGAGGAAGAACA
DZ447	GGTGCAATACTTCACTTTAGGACA	ATAGGAGTGGGACGGCTAGG
csolfagus_29	CACAACCTGCATTCCCTTTC	GTTTGGCACTTTGGCTTGTT
DUKCT	GCCTCTCGCAGCTCCTATAA	GATCTAATGTGGGTTTGGTTTTG
Fagsyl_002929	GCGGCGACTGGAATAATAGC	CAATCACACGCTGCACAAAC
Fagsyl_003849	GCTTCGTTCTTCGGCATCTC	AATAGCACAAATAGCCCCGCC
Fagsyl_001018	AATATCAGGGAGGCAGCACC	CGAGATGGACTTCTAAGTTTTATTT GC
Fagsyl_003093	TCATCACCGAGACAAGGGAC	ATGGTGGTGTGGAAGCTAGG

Multiplex DBZ_M1 a DBZ_M2 pro dub zimní

Multiplex 1		Délka (bp)	Objemy	Program		Reakce	
1 ^f	PIE239	70-100	0,300 ul	35x	95°C 5min	DNA	1 ul
2 ^f	PIE227	150-180	0,150 ul		95°C 45s	primery	3,42 ul
3 ^f	PIE271	180-220	0,150 ul		60°C 60s	H ₂ O	0,48 ul
4 ^f	PIE267	80-110	0,075 ul		72°C 45s	Type-It	4,9 ul
5 ^f	PIE258	125-160	0,300 ul		72°C 30min		
6 ^f	PIE020	95-120	0,135 ul		4°C ∞		
7 ^f	PIE152	240-260	0,300 ul			celkem	9,8 ul
8 ^g	ssrQrZAG 112	75-110	0,075 ul				
9 ^f	PIE102	140-170	0,090 ul				
10 ^f	PIE243	200-230	0,135 ul				
			1,710 ul				

Multiplex 2		Délka (bp)	Objemy	Program		Reakce	
1 ^h	ssrQpZAG 15	100-160	0,165 ul	35x	95°C 5min	DNA	1 ul
2 ^h	ssrQpZAG 110	210-230	0,15 ul		95°C 45s	primery	2,58 ul
3 ^g	ssrQrZAG 96	130-200	0,165 ul		60°C 60s	H ₂ O	0,32 ul
4 ^g	ssrQrZAG 11	220-300	0,375 ul		72°C 45s	Type-It	3,9 ul
5 ^g	ssrQrZAG 7	110-170	0,09 ul		72°C 30min		
6 ^f	PIE223	200-230	0,09 ul		4°C ∞		
7 ^f	PIE242	100-130	0,12 ul			celkem	7,8 ul
8 ^g	ssrQrZAG 20	150-200	0,135 ul				
			1,29 ul				

Pozn. Protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Původní zdroj primerových sekvencí:

f – Durand et al. 2010 (Guichoux et al. 2011), g – Kampfer et al. 1998, h – Steinkellner et al. 1997

Primerové sekvence		
Multiplex DBZ_M1		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
PIE239	TCAACAAATGGCTCAACAGTG	CCCATTGGTAGCAAAGAGTC
PIE227	TACCATGATCTGGGAAGCAAC	AAGGGCTTGGTTGGGTTAGT
PIE271	CACACTCACCAACCCTACCC	GTGCGGTTGTAGACGGAGAT
PIE267	TCCAACCATCAAGGCCATTAC	GTGCGAACAGATCCCTTGTC
PIE258	TTCTCGATCTCAAAACAAAACCA	TTTGATTGTGTTAAGGAAAATTGGA
PIE020	GCAGAGGCTCTTCTAAATACAGAACT	GGGAGGTTTCTGGGAGAGAT
PIE152	TGTACCTCTTTCCTCTCTCTAAACT	GAATTTCTAAACCACTAGCATTGAC
PIE102	ACCTTCCATGCTCAAAGATG	GCTGGTGATACAAGTGTTTGG
PIE243	GGGGTCAGTAGGCAAGTCTTC	GAGCTGCATATTTTCCTTAGTCAG
ssrQrZAG 112	TTCTTGCTTTGGTGCGCG	GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC
Multiplex DBZ_M2		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
ssrQpZAG 15	CGATTTGATAATGACACTATGG	CATCGACTCATTGTTAAGCAC
ssrQpZAG 110	GGAGGCTTCCTTCAACCTACTT	GATCTCTTGTGTGCTGTATTTTT
ssrQrZAG 96	CCCAGTCACATCCACTACTGTCC	GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA
ssrQrZAG 11	CCTTGAACCTCGAAGGTGTCC	GTAGGTC A AAACCATTGGTTGACT
ssrQrZAG 7	CAACTTGGTGTTTCGGATCAA	GTGCATTTCTTTTATAGCATTAC
ssrQrZAG 20	CCATTAAAAGAAGCAGTATTTTGT	GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA
PIE223	TAGAAGCCCAACACGGCTAC	AGCAAAACACAAACGCACAA
PIE242	TGGAGGGAAAAGAACAATGC	TTGCAATCCTCCAAATTTAATG

Multiplex JD_M1 a JD_M2 pro jedli bělokorou

Multiplex 1		délka	objemy	Program		Reakce	
1 ⁱ	Aat16	420-440	0,3 ul	1x	95°C 5min	DNA	1 ul
2 ⁱ	SF 324	100-130	0,75 ul		95°C 45s	primery	7,23 ul
3 ⁱ	Aag01	180-230	0,6 ul	33x	57°C 45s	H ₂ O	0,02 ul
4 ⁱ	Aat03	140-160	0,525 ul		72°C 60s	Type-It	8,25 ul
5 ⁱ	Aat06	200-210	0,15 ul	1x	72°C 30min		
6 ⁱ	Aat08	300-320	0,15 ul	1x	4°C ∞		
7 ⁱ	Aat09	150-160	0,06 ul				
8 ⁱ	SF g6	90-130	0,18 ul				
9 ⁱ	Aat01	100-120	0,06 ul				
10 ⁱ	Aag02	220-230	0,09 ul				
11 ⁱ	Aat13	333	0,135 ul				
12 ⁱ	SF b5	130-160	0,15 ul				
13 ⁱ	Aat02	120-130	0,105 ul				
14 ⁱ	Aat05	180-200	0,075 ul				
15 ⁱ	Aat11	250-265	0,09 ul				
16 ⁱ	Aat14	360-390	0,195 ul				
			3,615 ul				
Multiplex 2		délka	objemy	Program		Reakce	
1 ^k	NFH3	90-160	0,3 ul	1x	95°C 5min	DNA	1 ul
2 ⁱ	Aat07	210-250	0,6 ul		95°C 45s	primery	4,05 ul
3 ⁱ	Aat12	300-340	0,255 ul	33x	60°C 45s	H ₂ O	0,2 ul
4 ⁱ	SF b4	140-200	0,195 ul		72°C 60s	Type-It	5,25 ul
5 ⁱ	Aat15	360-370	0,075 ul	1x	72°C 30min		
6 ⁱ	Aat04	150-180	0,075 ul	1x	4°C ∞		
7 ⁱ	SF 83	203	0,075 ul				
8 ⁱ	Aat10	220-240	0,15 ul				
9 ^k	NFF3	120-150	0,135 ul				
10 ⁱ	SF 1	210-230	0,165 ul				
			2,025 ul				
						celkem	16,5 ul

Pozn. Protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Původní zdroj primerových sekvencí:

i – Postolache et al. 2014, j – Cremer et al. 2006, k – Hansen et al. 2005

Primerové sekvence		
Multiplex JD_M1		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
Aat01	CCATGTCTCCGATTTCCAGT	GGCCTAACGAAAGCAGAATC
Aat02	AGAAGATTTCCCGGCTTTTC	ATCCAGACAGCGAACTTTGG
Aat03	TCCCCATGGTTTGGTTAAAA	CGAAGAAAATGTTGCGGAAT
Aat05	AGCATCCACATTCCGTAACC	AGTTGACCGTTGGAGAGCAG
Aat06	TTATGCGGAGCAGTTCTGTG	TGTTGCTGGCGTACTGGTAG
Aat08	ACTCCATCACGGTGGTCTTC	GCCATTCAGGCTCTCAGTTC
Aat09	CAGATCCTCCCACATCCAAC	TGACACCACAGGAAACCATC
Aat11	AGCGTTGATTGGAAGCAGTC	GAAGCATGGTGTCGTTGTTG
Aat13	ACTCAAAGCCAAGCTGGAGA	TGCATAAGACAGCCGAGTCA
Aat14	GACTGGGGATCCTGCTGTTA	AGAGGAGGCAGCCCATACAT
Aat16	AACCACCGCTGATATTTTGG	GGGTTCAAGAAATGGGAATG
Aag01	GCTTATTCTCACTGCTCGCC	ATGACTTGAAGGTGGATGCC
Aag02	TATTCCTCCACTTGGGTGCT	GGTGGAGATCCGTATGCAAT
SF b5	AAAAAGCATCACTTTTCTCG	AAGAGGAGGGGAGTTACAAG
SF g6	GTAACAATAAAAGGAAGCTACG	TGTGACACATTGGACACC
SF 324	TTTGAACGGAAATCAAATTCC	AAGAACGACACCATTCTCAC
Multiplex JD_M2		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
NFH3	TTGCCATCAAATTAA AAATGCTT	CATCATTCTCTCTATCCCCATCA
NFF3	CCAATGGGTTGTCAGAGTGTT	GGCATTTCGAGATTGCTTGAT
Aat04	CCATGTATGGTGCTCCTCCT	CCTTCATTGCAGAAAAGCAA
Aat07	GCTAGCAGAACCCTGGAATG	GGTGGGATATTTCCAGCAAG
Aat10	GAGCACGATGAAGAGGAAGC	AAAACCCCCACGCGGTAT
Aat12	ATCCATATCTCCTGCCTTGC	CTTTCCAGGTGATCTGATTGC
Aat15	AGGAGGAGGTTACAGCATGTC	CTTGCTCTCTGACCCAGTTG
SF b4	GCCTTTGCAACATAATTGG	TCACAATTGTTATGTGTGTGG
SF 83	AGCAGCATAACCAAGGGTCAA	TCTGAATTTCTAAAGGCGGC
SF 1	TTGACGTGATTAACAATCCA	AAGAACGACACCATTCTCAC

Multiplex SM_M1 a SM_M2 pro smrčk ztepilý

Multiplex 1		délka (bp)	objem	PCR program		Reakce	
1 ^l	paGB3	113-131	0,200 ul	1x	95°C 15min	DNA	1 ul
2 ^m	WS0022.B15	176-212	0,500 ul		95°C 30s	primery	5,34 ul
3 ⁿ	SpAGD1	126-172	0,500 ul	40x	60°C 45s	H ₂ O	0,46 ul
4 ⁿ	SpAG2	84-115	0,120 ul		72°C 30s	Type-It	6,8 ul
5 ^o	EATC1E03	129-139	0,100 ul	1x	60°C 30min		
6 ^m	WS00716.F13	209-245	1,040 ul	1x	4°C ∞		
7 ^p	Pt71936 *	138-148	0,025 ul			celkem	13,6 ul
8 ^p	Pt63718 *	100-102	0,035 ul				
9 ^o	EATC1D02A	185-237	0,150 ul				
			2,670 ul				
*) chloroplastové lokusy							
Multiplex 2		délka (bp)	objem	PCR program		Reakce	
1 ^m	WS0073.H08	199-217	0,075 ul			DNA	1 ul
2 ^q	Pa_28	153-173	0,060 ul	1x	95°C 5min	primery	3,27 ul
3 ^r	PAAC23	273-313	0,075 ul		95°C 45s	H ₂ O	0,43 ul
4 ^m	WS0092.A19	215-235	0,300 ul	35x	59°C 60s	Type-It	4,7 ul
5 ^m	WS0023.B03	171-203	0,150 ul		72°C 45s		
6 ^q	Pa_33	100-106	0,225 ul	1x	72°C 30min		
7 ^m	WS0019.F22	363-369	0,150 ul	1x	4°C ∞		
8 ^q	Pa_56	123-140	0,300 ul			celkem	9,4 ul
9 ^r	PAAC3	240-314	0,300 ul				
			1,635 ul				

Pozn. Protokol je platný pro koncentraci DNA 20 ng/ul a koncentraci primerů 10mM

Původní zdroj primerových sekvencí:

l – Besnard et al. 2003, m – Rungis et al. 2004, n – Pfeiffer et al. 1997, o – Scotti et al. 2002, p – Vendramin et al. 1996, q – Fluch et al. 2011, r – Scotti 2000

Primerové sekvence		
Multiplex SM_M1		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
paGB3	AGTGATTAAACTCCTGACCAC	CACTGAATACACCCATTATCC
WS0022.B15	TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG	TGGCTTTTTATTCCAGCAAGA
WS00716.F13	TCAAGTAATGGACAAACGATACA	TTTCCAATAGAATGGTGGATTT
SpAGD1	GTCAACCAACTTGTAAGCCA	ACTTGTTGGCATTTCCTCC
SpAG2	GCTCTTCACGTGTACTTGATC	TTCGAAGATCCTCCAAGATAC
EATC1E03	CCCCTTATTCCTAACGTCAAA	TACCAGTGGTGACAACGATG
EATC1D02A	TTGTCATCGTCGTCATTGTC	TTTAGCCTCTGTTTTCTAGCG
Pt63718	CACAAAAGGATTTTTTTTCAGTG	CGACGTGAGTAAGAATGGTTG
Pt71936	TTCATTGGAAATACACTAGCCC	AAAACCGTACATGAGATTCCC
Multiplex SM_M2		
Lokus	Forward primer	Reverse primer
Pa_28	GGCCGAAAGTGCTACTGCTA	TGCTCCAGAAGAACAACCTCACA
Pa_33	GGTCGAGGAGGAGGAGGTAG	CACCGCTAGTGCAGTCTCTG
Pa_56	ATCGTCTGCATTGCATTAC	CTTCGTTCCCTTCCTGATCCA
PAAC23	TGTGGCCCCACTTACTAATATCAG	CGGGCATTGGTTTACAAGAGTTGC
PAAC3	CGCTACCTCAGATTTCTCCA	AGATATTCCCTCACAAAGTTGG
WS0073.H08	TGCTCTCTTATTCGGGCTTC	AAGAACAAGGCTTCCCAATG
WS0092.A19	TGTGGTTTTCTGCTTGGAAG	CCCATTTTGACTTTGAAATAAGC
WS0023.B03	AGCAGCTGGGGTCAAAGTT	AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG
WS0019.F22	AAGCGTTTCTCATTTTCTTGG	GGGCCAGAACTAACAATGA

2.2.4. Rekonstrukce rodokmene – určování rodičovství

Vstupními daty pro analýzu rodičovství jsou údaje o délce amplikonů jednotlivých mikrosatelitových lokusů (tzn. alely). Výstupy získané z fragmentačního přístroje (např. přístroj Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500) jsou vyhodnocovány příslušným softwarem (např. GeneMarker®, GeneMapper® či jiný).

Nejjednodušším přístupem k rekonstrukci rodokmene je metoda přímého vyloučení všech rodičovských kandidátů, kteří nejsou ze 100% potenciálně možnými rodiči, nejsou tedy kompatibilní napříč všemi ověřovanými mikrosatelitovými lokusy. Tato nejjednodušší technika aplikuje principy Mendelových zákonů dědičnosti a hledá potenciální genotypovou neslučitelnost mezi domnělým rodičem a jeho potomkem. Prakticky, z důvodu genotypizačních chyb, fenoménu nulových alel či mutací je striktní přístup vyloučení rodičovství v praxi vyloučen.

Vhodné počítačové programy pro analýzu rodičovství nicméně umožňují tento aspekt ošetřit nastavením počtu tolerovaných alelických neshod, které jsou nutné pro vyloučení jedince jako rodičovského kandidáta. Při určování rodičovských vazeb je vhodné využít tzv. kategorickou techniku, kdy pro potomka jsou určeni nepravděpodobnější rodiče pomocí pravděpodobnostního principu, který je určován jako logaritmus pravděpodobnostního poměru (LOD skóre). Pravděpodobnost, že potenciální jedinec je skutečným rodičem, je indikována pozitivní hodnotou LOD skóre. Pouze za předpokladu, že je LOD skóre statisticky signifikantní, je potenciální rodič považován za průkazně potvrzeného rodiče. Další statistický parametr odvozený z pravděpodobnostního poměru je delta, která je definována jako rozdíl hodnot LOD skóre mezi nejpravděpodobnějším a druhým nejpravděpodobnějším rodičem a je dalším kritériem pro determinaci rodičovských vazeb.

Počítačové programy pro rekonstrukci rodokmene – určování rodičovství

Aktuálně je dostupné značné množství počítačových programů a utilit, které lze využít pro posuzování příbuzenských vazeb. Volba vhodného programu závisí na charakteru vstupních dat, typu požadované analýzy a často také charakteru studované populace a analyzovaném souboru jedinců. Pravděpodobně nejzásadnější rozdíl mezi programy je úroveň, se kterou mohou pracovat s nulovými alelami, mutacemi a genotypizačními chybami.

Neošetřená přítomnost nulových alel může způsobit falešné vyloučení pravého rodiče, pokud je heterozygot nesprávně detekován jako homozygot. Vodítkem pro detekci nulových alel je především významná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na příslušném lokusu. Pokud je spolehlivě znám mateřský jedinec (např. jde o semena získaná z konkrétního stromu), lze výskyt nulových alel posoudit s vyšší efektivitou. Údaj o předpokládaném podílu analyzovaných jedinců rodičovské populace je také významným parametrem ve spolehlivosti rodičovské analýzy (Marshall et al. 1998). Proto je zásadním faktorem maximalizace odběru jedinců v rodičovské populaci, jinými slovy čím dokonalejší bude zmapování rodičovské populace, tím spolehlivější je rekonstrukce rodokmene. Pro rekonstrukci rodokmene (určení příbuzenských vztahů) je doporučen software CERVUS (Kalinowski et al. 2007), který pracuje s výše popsáním pravděpodobnostním přístupem (likelihood-based approach). Jedná se o volně

dostupný freeware, který je k dispozici na webových stránkách <http://www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervusUsing.jsp>.

Na rozdíl od genotypizačního protokolu (sety navržených primerů a reakční podmínky), které je žádoucí do budoucna zachovávat z důvodu vzájemné kompatibility dat – vytvoření databanky, je vyhodnocení dat a určení příbuzenských vazeb pomocí programu CERVUS považováno za doporučené, jednu alternativu z více možných. Specialista-genetik, který bude analýzu příbuzenských vazeb zpracovávat, může navrhnout alternativní přístup (např. jiný software), pokud jej vyhodnotí jako vhodnější.

2.2.5. Možnosti využití metodiky pro jednotlivé typy zdrojů reprodukčního materiálu (hledisko podchycení jedinců rodičovské populace)

1. Zdroj semene

Zdrojem semen se rozumí strom nebo skupina stromů rostoucích na pozemku určeném k plnění funkcí lesa, popřípadě i strom rostoucí mimo les a to pro generativní způsob reprodukce.

Při odběru semen z tohoto zdroje je předpokladem důkladné podchycení jedinců mateřské populace. Současně se sběrem semen je žádoucí vzorkovat také mateřské stromy (rodiče rodiny) a to buď ve formě asimilačního pletiva (preferenčně pupeny či listy a nebo jehlice) nebo jako výsek vrstev kůry včetně kambiální vrstvy.

Tento typ zdroje může zahrnovat často značný počet jedinců, především v případě, že se jedná o méně kvalitní zdroj, který nemůže být uznán v kategorii porost. Využití metodiky ověřování původu není v takových případech nekvalitních zdrojů opodstatněné.

Předpoklady: jednoznačně vymezený zdroj, sběr semen přímo ze stromu nebo záchyt do plachet s minimální pravděpodobností příměsi z jedinců mimo deklarovanou rodičovskou populaci

2. Porost

Porostem se rozumí ohraničená populace stromů a to pro generativní i vegetativní způsob reprodukce.

Pro vegetativní způsob reprodukce je současně s odběrem reprodukčního materiálu žádoucí odebrat také vzorek z rodičovského stromu (ortetu). Genetická informace z tohoto zdroje reprodukčního materiálu bude identická s genotypem kontrolního vzorku, jedná se v podstatě o ověření klonové shody.

V případě využití porostu jako zdroje reprodukčního materiálu pro generativní způsob reprodukce je faktickou limitací značný počet jedinců rodičovské populace, kteří by museli být genotypováni.

Předpoklady: užší vymezení potenciální rodičovské populace (např. sběr ze stojících či pokácených stromů, záchyt do plachet apod.)

3. Semenný sad

Semenný sad je účelová výsadba selektovaných klonů nebo specifického reprodukčního materiálu s důrazem na omezení sprášení pylem ze zdroje mimo semenný sad a to pro generativní způsob reprodukce.

Běžným typem je klonový semenný sad, kdy jsou jednotlivé klony zastoupeny větším počtem ramet příslušného klonu. Dle legislativní definice semenného sadu je kladen důraz na

minimalizaci sprášení pylem ze zdroje mimo semenný sad, reálně je však proporce semen vzniklých z otcovských gametických příspěvků pocházejících mimo semenný sad nenulová.

Předpoklady: nejvhodnější typ zdroje reprodukčního materiálu pro uplatnění metodiky (superiorní genetická informace, relativně malý počet jedinečných genotypů rodičovské populace, jednoznačně vymezený zdroj rodičovské populace)

4. Rodič rodiny

Rodič rodiny označuje strom určený k produkci potomstva kontrolovaným nebo volným opylováním pro generativní způsob reprodukce.

Předpoklady: jednoznačně vymezený zdroj, sběr semen přímo ze stromu nebo záchyt do plachet s minimální pravděpodobností příměsi z jedinců mimo deklarovanou rodičovskou populaci

5. Klony

Klonem se rozumí skupina vegetativních potomků (ramety) získaných z výchozího jedince vegetativním množením.

Klonovou příslušnost lze ověřit prostým porovnáním genotypů bez potřeby rekonstrukce rodokmene. Přesto je i v tomto případě vhodné použít k posouzení příslušný počítačový program, který umožní nastavit parametr tolerovatelné chyby posouzení identičnosti genetických profilů. Z praktického pohledu je dostačující pro příslušnou zájmovou dřevinu využít vždy pouze jeden z navržených multiplexů.

Předpoklady: bez specifických předpokladů

6. Směs klonů

Směsí klonů se rozumí soubor klonů se stanovenými podíly jednotlivých klonů pro vegetativní způsob reprodukce.

Klonovou příslušnost lze ověřit prostým porovnáním genotypů bez potřeby rekonstrukce rodokmene. Přesto je i v tomto případě vhodné použít k posouzení příslušný počítačový program, který umožní nastavit parametr tolerovatelné chyby posouzení identičnosti genetických profilů. Z praktického pohledu je dostačující pro příslušnou zájmovou dřevinu využít vždy pouze jeden z navržených multiplexů.

Předpoklady: bez specifických předpokladů

7. Ortet

Ortet je strom určený k odběru částí rostlin pro vegetativní způsob reprodukce.

Pro posouzení příslušnosti částí rostlin či jedinců z těchto částí rostlin vzniklých dochází v podstatě k posuzování klonové příslušnosti. Pro jednoznačné posouzení nutno analyzovat všechny zájmové jedince či části rostlin, dostačující je k analýze genetické informace využít jeden multiplex.

Předpoklady: bez specifických předpokladů

2.2.6. Stanovení hraničních hodnot rekonstrukce rodokmene

Vědecké práce studující míru úspěšnosti určení rodičovství v populacích s deklarovanou příbuzenskou vazbou ukazují značné rozdíly ve zjištěném stavu, a to v závislosti na typu reprodukční dynamiky příslušné dřeviny a podmínkách prostředí. Dokonce i vědecké studie na osivu ze semenného sadu, kdy je příslušnost k mateřskému jedinci jednoznačně známa (sběr osiva přímo z mateřského stromu), a posuzuje se tak pouze otcovský rodičovský příspěvek, vykazují značný rozptyl hodnot v počtech dohledaných otců, a to v rozmezí od jednotek až téměř po sto procent úspěšnosti.

Ačkoliv nelze z podstaty probíhajících a výše popsaných přírodních stochastických procesů jednoznačně nadefinovat procentuální hraniční hodnoty, lze konstatovat:

- a) Pro ověřovaný soubor jedinců, u kterého bude rekonstrukce příbuzenských vazeb zjevně neúspěšná (tj. maximálně 5% úspěšnosti (v závislosti na zvolené statistické chybě)). Lze konstatovat, že reprodukční materiál nepochází z deklarované rodičovské populace.
- b) Parciální úspěšnost určení rodičovství (v rozmezí 5% až 95% úspěšnosti určení jednoho rodiče s nenulovým určením druhého rodiče) je třeba posuzovat jako pravděpodobný směsný vzorek různých genetických zdrojů, kde jedinci deklarovaného původu tvoří pouze část populace (mísení zdrojů).
Jelikož je tento nejednoznačný výstup pouze odrazem faktické skutečnosti stavu, je třeba volit nasazení metodiky tak, aby byla tato potenciální nejednoznačnost *apriori* eliminována.
- c) Analyzované skupiny, kde se určení prvního rodiče přibližuje 100% a určení druhého rodiče dosahuje desítek procent, lze bezpečně považovat za potvrzení původu z deklarovaného zdroje. Míra přiřazení druhého rodiče může být v takové situaci i významně nižší (viz kontaminační studie semenných sadů), nicméně pravděpodobnost určení prvního rodiče (matky) by se měla přibližovat 100% (tolerance v závislosti na statistické chybě, standardně 5%).

Je třeba opětovně zdůraznit, že z podstaty probíhajících procesů a faktorů chybovosti nelze kritické hodnoty jednoznačně vymezit, můžeme hovořit pouze o jednoznačných trendech hodnot. Reálné kritické hodnoty jsou individuální pro každý jednotlivý řetězec, v závislosti na jeho charakteru a často i druhu dřeviny. Tyto faktory musí být zohledněny genetikem – expertem při analýze dat a zpracování posudku. Pro analýzu je doporučeno maximalizovat

počet jedinců deklarované rodičovské populace, standardní doporučená velikost souboru ověřovaných jedinců je 100 ks.

2.2.7. Modelový postup ověřování původu reprodukčního materiálu

Praktická ukázka postupu ověřování deklarovaného původu sadebního materiálu je dokumentována na modelovém scénáři, který lze v provozních podmínkách LČR, s.p. realizovat. Ověření původu bude realizováno na zakázce produkce sadebního materiálu, která vzešla z dynamického nákupního systému. Jednotlivé uzly produkčně-distribučního řetězce jsou tak jednoznačně určeny, respektive je v rámci zadání zakázky vyloučeno subdodavatelské zpracování. Zadavatel také specifikuje a zpracovateli zakázky fyzicky přímo dodá zdrojový semenný materiál. Toto nastavení výchozí situace eliminuje riziko nejednoznačného závěru ověřování.

Předmětem produkce budou sazenice z osiva původem ze semenného sadu, které je geneticky superiorní, a právě na takové zdroje by měl být v případě nasazení metodiky zájem primárně soustředěn.

Veškerý dohled nad sběrem, manipulací a evidencí reprodukčního materiálu a vzorků pro genetickou analýzu je navržen v kompetenci odborného pracovníka – specialisty. Izolace DNA a generování molekulárních dat se uskuteční v externí genetické laboratoři, vyhodnocení a stanovení závěru provede buď přímo interní specialista, v případě potřeby nezávislý externí specialista.

1. Sběr osiva v semenném sadu, odběr vzorků pro analýzu genetického profilu rodičovské populace

- Sběr osiva proběhne pod dohledem specialisty, který při sběru osiva zajistí také odběr vzorku asimilačního aparátu pro genetickou analýzu všech klonů v semenném sadu – konkrétní počet vzorků závisí na počtu klonů v semenném sadu.
- Pro ověření správnosti evidenční příslušnosti jedinců v semenném sadu se doporučuje odebrat od každého klonu vzorky ze dvou ramet. Tj. pokud semenný sad obsahuje 50 klonů, bude rodičovská populace reprezentována 100 vzorky s předpokladem zjištění 50 různých genotypů.
- Odebrané vzorky budou řádně označeny a uskladněny dle metodiky.

2. Zpracování semenného materiálu

- Semenný materiál bude řádně zpracován (např. v semenářském závodě v Týništi nad Orlicí) s důrazem na maximální obezřetnost při manipulaci, je tak eliminováno riziko záměny osiva v tomto uzlu.

3. Předání osiva zpracovateli zakázky - pěstiteli

- Pěstiteli bude veškeré osivo fyzicky předáno. Při převzetí pěstitelem bude zároveň odebrán směsný vzorek semen dle zásad náhodného výběru (a v množství s rezervou dle předpokládané klíčivosti tak, aby mohl být později analyzován genotyp 100 klíčících rostlin).
- Toto osivo bude zapečetěno a patřičně uskladněno v semenářském závodě do doby provedení analýzy.

4. Ověření původu produkovaného sadebního materiálu

- Ze 100 vypěstovaných sazenic budou odebrány vzorky pro izolaci DNA a ověření jejich deklarovaného původu, jejich výběr opět proběhne dle zásad náhodného výběru (např. v analogii normy ČSN 48 2118).

5. Izolace DNA ze vzorků rodičovské populace, vzorku osiva a vzorku ze sadebního materiálu, genotypizace

- Izolace DNA v externí laboratoři z příslušných vzorků
- U osiva se doporučuje uskutečnit naklíčení semen a DNA izolovat z klíčících rostlin, nicméně izolace DNA přímo z embrya je taktéž možná
- Provedení genotypizace s využitím navržených SSR multiplexů

6. Porovnání genetických profilů jedinců rodičovské populace, rekonstrukce rodokmene, stanovení závěru

- Porovnání genetických profilů ramet příslušných klonů. Případný evidenční nesoulad není překážkou pro ověření deklarovaného původu, jelikož se dohledává faktická příslušnost k oběma rodičům, evidenční příslušnost ke konkrétnímu klonu není deklarována.
- Rekonstrukce rodokmene se vzorky s osiva.
- Rekonstrukce rodokmene pro vzorky ze sadebního materiálu.

Možné závěry:

- a) Rekonstrukce rodokmene se vzorky z osiva nebyla úspěšná: Nebyl potvrzen deklarovaný původ osiva v okamžiku jeho předání pěstiteli
- b) Rekonstrukce rodokmene se vzorky z osiva proběhla úspěšně, lze přistoupit k rekonstrukci rodokmene pro výpěstky
- b1) rekonstrukce rodokmene pro výpěstky nebyla úspěšná – nebyl potvrzen deklarovaný původ sazenic z osiva, které mělo deklarovaný původ

b2) rekonstrukce rodokmene pro výpěstky byla úspěšná, byl potvrzen deklarovaný původ reprodukčního materiálu

Specialista je schopen posoudit a vyřešit případné nestandardní či specifické situace, které by v průběhu procesu ověřování deklarovaného původu nastaly.

2.2.8. Závěry a doporučení pro využití metodiky

Předpokladem pro širší využívání metodiky a její snazší implementaci je nastavení závazných pravidel, která v maximální možné míře umožní podchycení genetického profilu rodičovské populace. Jde především o současný odběr vzorku pro genetickou analýzu při sběru reprodukčního materiálu. Dalším aspektem je ustanovení nezávislého subjektu (např. pověřená osoba ve smyslu ustanovení legislativních předpisů o reprodukčním materiálu lesních dřevin), v jehož kompetenci bude dohled nad odběrem vzorků v rodičovské populaci, odběr směsného vzorku pro posouzení příslušnosti k deklarované rodičovské populaci, případně zajištění uskladnění odebraného materiálu do doby provedení analýzy či analýza samotná.

Doporučení konkrétních pravidel, která by měla mít legislativní oporu, by mělo být výsledkem důkladné dlouhodobější analýzy a hledání konsenzu zainteresovaných subjektů (ministerstvo, ÚHÚL, majoritní správci či vlastníci lesů, specializovaná vědecká pracoviště atd.).

Naprostou většinu přírodních procesů lze označit za procesy stochastického charakteru, které probíhají, minimálně v rámci užšího studovaného celku, náhodně. Mezi ně bezpochyby spadají polinační procesy a následná produkce semen. Při analýze směsného testovacího vzorku proto nelze *apriori* předpokládat, že rekonstrukce rodokmene (určení rodičovství) bude v případě skutečného původu v deklarované rodičovské populaci stoprocentně úspěšná. Důvodem je především aspekt genového toku, kdy pyl může být přenášen často i stovky kilometrů. Původce pylu tedy není reálné podchytit v souboru genetických profilů potenciální rodičovské populace. Lze ovšem očekávat velmi vysokou proporcí úspěšně přiřazeného prvního rodiče (matky) blížící se 100% a v naprosté většině případů také nezanedbatelnou proporcí úspěšného přiřazení druhého rodiče (otce).

Pro analýzu genetické informace reprodukčního materiálu je odebírán směsný vzorek – doporučuje se analyzovat 100 jednotek reprodukčního materiálu. Způsob výběru jedinců by se měl opírat o metody náhodného výběru, tj. technicky provedeného tak, aby každá jednotka měla statisticky stejnou a nezávislou možnost stát se součástí výběru. Při vzorkování sazenic na záhonech se doporučuje postupovat v analogii s normou ČSN 48 2118 Inventarizace sadebního materiálu lesních dřevin ve školkách. Při odběru vzorku osiva je před odběrem nezbytné zajistit jeho dokonalé promíslení. Pokud jde o vzorkování deklarované rodičovské populace, je nezbytné maximalizovat úsilí a odebrat vzorek ideálně ze všech potenciálních rodičovských (mateřských) jedinců.

Navržená metoda analýzy je teoreticky aplikovatelná na všechny typy zdrojů reprodukčního materiálu. Jelikož je ale pro precizní rekonstrukci rodokmene nutné získat genotypy ideálně všech jedinců rodičovské populace, má tento přístup určité limity. Z praktického pohledu je racionální soustředit se především na superiorní zdroje reprodukčního materiálu. Vytvořený kontrolní nástroj má význam především pro ověření, zda v produkčním řetězci zůstává zachován a zpět do lesních porostů se vrací geneticky kvalitní a tedy žádoucí materiál. Takové zdroje reprodukčního materiálu mají většinou jednoznačně vymezenou oblast původu, kterou je nejčastěji semenný sad. U takových zdrojů reprodukčního materiálu je metodika prakticky snadno uplatnitelná.

3. Srovnání novosti postupů

V legislativě zakotvené předpisy a doporučení přenosu reprodukčního materiálu se opírají především o dlouhodobé empirické zkušenosti odborníků a obecně uznávaná pravidla, méně však již o aktuální vědecké studie a výzkumy. Lze proto předpokládat, že po období dočasného uvolnění pravidel přenosu reprodukčního materiálu kvůli akcelerovanému zalesňování kalamitních holin, dojde k jejich úpravám.

Molekulárně genetické postupy zde mají své nezastupitelné místo, jelikož jsou jediným objektivním nástrojem, který lze použít při ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu.

Protokoly pro mikrosatelitovou analýzu konkrétních druhů lesních dřevin byly v minulosti publikovány, a to i českými výzkumnými týmy (např. certifikované metodiky Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.). Doposud však neexistovala ucelená, komplexní a zobecněná metodika postupu ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu od vhodného způsobu odběru materiálu až po stanovení závěru.

Posouzení deklarovaného původu v této metodice je principiálně založeno na přístupu porovnávání (komparace) genetických profilů. Srovnává se genetická informace filiální generace, tj. směsný vzorek jedinců (sazenic či případně přímo osiva), u kterých je požadavek na ověření deklarované příslušnosti. Posuzuje se vztah genetické informace potomků ke genetické informaci deklarované rodičovské populace. Jinými slovy, dochází k rekonstrukci rodokmene (určení příbuzenských vazeb potomek – rodič). Ze zahraničí jsou známy snahy o vytvoření postupů ověřování deklarovaného původu RM na základě porovnání genetického profilu zájmových vzorků s databází genetických profilů jedinců z geograficky shodné oblasti. Tento postup však není z důvodu relativně intenzivního genového toku mezi populacemi dostatečně robustní a spolehlivou metodou pro jednoznačné potvrzení či vyvrácení deklarovaného původu.

4. Popis uplatnění metodiky

Předložená metodika najde uplatnění při potřebě ověření deklarovaného původu reprodukčního materiálu lesních dřevin. Jelikož mikrosatelitové genotypizační platformy jsou druhově specifické, je tato metodika zaměřena na konkrétní druhy lesních dřevin, a to smrk ztepilý, jedlí bělokorou, buk lesní a dub zimní. Celkový metodický koncept ověřování je však všeobecně platný, a to bez ohledu na druh dřeviny. Proto v případě existence vhodného panelu markerů pro příslušnou dřevinu (tyto panely jsou průběžně vyvíjeny a publikovány) je metodika aplikovatelná na jakoukoliv dřevinu.

Některé z kroků mohou být prováděny proškolenými provozními zaměstnanci (odběr materiálu k izolaci DNA). Většina aktivit, jako například izolace DNA, amplifikace mikrosatelitových lokusů, vyhodnocení a konstatování závěru o deklarovaném původu vyžaduje provedení specialistou s příslušnou odborností (molekulární biologie a lesnictví).

Metodika je principiálně určena jakémukoliv zájemci z řad vlastníků lesů, organizacím či podnikům s předmětem činnosti v oblasti lesního hospodářství či ochraně životního prostředí a orgánům státní správy (zejména ÚHÚL). Reálně se předpokládá využití metodiky velkými vlastníky a správci lesů (LČR, s.p., VLS, s.p.), kteří by z pozice majoritních správců státních lesů měli mít možnost využít všech dostupných analytických nástrojů, a to s dlouhodobým cílem trvale udržitelného hospodaření a zajištění stability lesních ekosystémů.

Zásadním kritériem pro právně nezpochybnitelné výstupy metodiky je možnost kontroly charakteru genetické struktury reprodukčního materiálu v každém uzlu, při kterém dochází ke změně subjektu v produkčně-distribučním řetězci. V teoretické rovině je možné provádět při každé změně v řetězci odběr kontrolního vzorku (doporučeno optimálně 100) pro návazné ověření, zda jde v celém řetězci o tentýž reprodukční materiál deklarovaného původu. V případě složitějších spotřebitelských řetězců však může být provozní využití metodiky méně reálné, a to z pohledu organizačního, finančního i faktického přínosu takové analýzy. Praktická uplatnitelnost metodiky u LČR, s.p. je významně umocněna zavedením dynamického nákupního systému, při kterém mohou být vhodně ošetřeny jednotlivé uzly distribučního řetězce a zároveň může být zadavatelem zakázky jednoznačně určen a dodán konkrétní zdroj reprodukčního materiálu pro produkci sazenic. Zadavatel zároveň může vymezit požadavky na komplexní realizaci produkce vítězem zakázky bez možnosti subdodavatelského zpracování a podobně.

V současnosti (rok 2019) došlo v reakci na kalamitní kůrovcovou situaci k uvolnění legislativních pravidel přenosu RM a mohlo by se tedy zdát, že metodika ztrácí na své důležitosti. Jde však o opatření dočasného charakteru, a byť není vyloučeno, že současná pravidla přenosu RM zakotvená v legislativě budou upravena, tak nástroj umožňující rigorózní ověření deklarovaného původu RM bude mít beze sporu i nadále svůj význam.

Metodiku je navíc nejefektivnější využívat především u superiorních či jinak význačných zdrojů reprodukčního materiálu (lokálně význačné populace, adaptované populace se zvýšenou odolností a stabilitou, zdroje ze semenných sadů atd.). U těchto specifických a vysoce

hodnotných zdrojů je obzvláště přínosné mít možnost ověřit deklarovaný původ, a to případně i nad rámec předepsaných legislativních mantinelů.

5. Ekonomické aspekty

Náklady na provedení ověřování deklarovaného původu pomocí metodiky a následný budoucí ekonomický přínos zavedení daného metodického postupu závisí primárně především na účelu a rozsahu genetických analýz, které budou pomocí navržených metodických postupů realizovány. Doporučované molekulárně-genetické nástroje jsou druhově specifické, v obecné rovině je tedy třeba vyvinout je pro každý druh zájmové lesní dřeviny samostatně.

Cenová hladina následných rutinních analýz se pohybuje v rozmezí několika stokorun na jeden vzorek. Náklady na analýzu jednoho vzorku jsou významně odvislé také od celkového počtu analyzovaných vzorků. Větší počet analyzovaných vzorků snižuje náklady na jednotkovou analýzu. V rámci vytváření metodiky byla provedena stěžejní efektivizace finanční náročnosti, a to sestavením multiplexů s maximalizovaným počtem fluorescenčně značených markerů v jedné reakci.

Ekonomický přínos ve smyslu navýšení budoucího zisku (např. diferenciální zisk z produkce dřevní hmoty) je těžko vyjádřitelný, jelikož jde o dlouhodobý proces přesahující dobu obmýtí, do kterého vstupuje mnoho nepredikovatelných faktorů. Zásadní je však přínos metodiky pro stabilizaci či zlepšení mimoprodukčních funkcí lesních porostů. Pokud bude díky aplikaci zajištěno využívání vhodných zdrojů reprodukčního materiálu, je předpoklad, že takto vzniklé porosty budou odolnější a schopny větší měrou odolávat důsledkům klimatických změn.

6. Seznam použité související literatury

- Asuka, Y., Tani, N., Tsumura, Y., & Tomaru, N. (2004). Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 101-103.
- Besnard, G., Acheré, V., Faivre Rampant, P., Favre, J. M., & Jeandroz, S. (2003). A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology Notes*, 3(3), 380-383.
- Cremer, E., Liepelt, S., Sebastiani, F., Buonamici, A., Michalczyk, I. M., Ziegenhagen, B., & Vendramin, G. G. (2006). Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 374-376.
- Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J. M., Vendramin, G., Sebastiani, F., ... & Mattioni, C. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC genomics*, 11(1), 570.
- Fluch, S., Burg, A., Kopecky, D., Homolka, A., Spiess, N., & Vendramin, G. G. (2011). Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research notes*, 4(1), 401.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Léger, P., & Petit, R. J. (2011). Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 578-585.
- Hansen, O. K., Vendramin, G. G., Sebastiani, F., & Edwards, K. J. (2005). Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 784-787.
- 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(5), 1099-1106.
- Kampfer, S., Lexer, C., Glossl, J., & Steinkellner, H. (1998). Brief report characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, 129(183), 1-86.
- Lefèvre, S., Wagner, S., Petit, R. J., & De Lafontaine, G. (2012). Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 484-491.
- Marshall, T. C., Slate, J. B. K. E., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639-655.
- Pastorelli, R., Smulders, M. J. M., Van't Westende, W. P. C., Vosman, B., Giannini, R., Vettori, C., & Vendramin, G. G. (2003). Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 76-78.
- Pfeiffer, A., Olivieri, A. M., & Morgante, M. (1997). Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40(4), 411-419.

Postolache, D., Leonarduzzi, C., Piotti, A., Spanu, I., Roig, A., Fady, B., ... & Vendramin, G. G. (2014). Transcriptome versus genomic microsatellite markers: highly informative multiplexes for genotyping *Abies alba* Mill. and congeneric species. *Plant molecular biology reporter*, 32(3), 750-760.

Pluess, A. R., & Määtänen, K. (2013). Characterization of eighteen novel microsatellite markers and multiplex PCR protocol for *Fagus sylvatica*. *Conservation genetics resources*, 5(2), 311-314.

Rungis, D., Bérubé, Y., Zhang, J., Ralph, S., Ritland, C. E., Ellis, B. E., ... & Ritland, K. (2004). Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1283-1294.

Scotti, I., Magni, F., Fink, R., Powell, W., Binelli, G., & Hedley, P. E. (2000). Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43(1), 41-46.

Scotti, I., Magni, F., Paglia, G., & Morgante, M. (2002). Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(1), 40-50.

Steinkellner, H., Fluch, S., Turetschek, E., Lexer, C., Streiff, R., Kremer, A., ... & Glössl, J. (1997). Identification and characterization of (GA/CT) n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*, 33(6), 1093-1096.

Tanaka, K., Tsumura, Y., & Nakamura, T. (1999). Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. japonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1-2), 11-15.

Vendramin, G. G., Lelli, L., Rossi, P., & Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5(4), 595-598.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Publikace

Čepl J, Stejskal J, Lhotáková Z, Holá D, Korecký J, Lstibůrek M (2018) Heritable variation in needle spectral reflectance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) peaks in red edge. Remote Sensing of Environment, 219, 89-98 pp

Korecký J, Bílý J, Sedlák P, Lstibůrek M (2017) Innovative multiplex and its evaluation for effective genotyping of wild cherry, Silva Fennica, 51(3), id 5644

Korecký, J., Lstibůrek, M., & El-Kassaby, Y. A. (2014). Congruence between theory and practice: reduced contamination rate following phenotypic pre-selection within the Breeding without Breeding framework. Scandinavian journal of forest research, 29(6), 552-554.

Výstupy ze znalostí/publikace v přípravě

Bínová Z., Korecký J. et al. Genetic structure of Norway spruce ecotypes studied by SSR markers (žurnál Forests)

Dvořák J. et al. Genetic diversity of Sessile oak in selected populations in the Czech Republic
Zádrapová D. et al. Genetic diversity in selected indigenous populations of European beech in the Czech Republic characterized by microsatellite markers