

Sledování genetické diversity smrku ve vybraném porostu v Krkonoších jako podklad pro modelování vlivu výchovy na genetickou strukturu populace dřeviny

Ondřej Ivanek¹⁾, Karel Matějka²⁾

¹⁾ Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Útvar biologie a šlechtění lesních dřevin, Strnady 136, 252 02 Jíloviště

²⁾ IDS, Na Komořsku 2175/2a, 143 00 Praha 4

Úvod

V rámci projektu 2B06012 "Management biodiversity v Krkonoších a na Šumavě" byl navržen experiment modelování vývoje genetické struktury vybrané populace smrku *Picea abies* L.) v závislosti na různých zvolených modelech hospodaření (viz www.infodatasys.cz/biodivkrsu/projekt.pdf). Předpokladem tohoto řešení je provedení detailní genetické analýzy vybrané populace. Ve spolupráci s hlavními řešiteli projektu byla vybrána populace reprezentovaná jedním porostem v centrální oblasti Krkonoš poblíž Špindlerovky.

Předložený dílčí projekt navazuje na genetický screening populací smrku ztepilého pomocí isoenzymových analýz, prováděných v různých oblastech přírodních lesních oblastech České republiky. V případě smrku ztepilého se na území ČR jedná ve většině případů pouze o fragmenty autochtonních porostů, absolutní většina porostů je kulturního původu. Řešení projektu spočívá ve výběru části kvalitního porostu smrku ztepilého a jeho detailním genetickým zmapování pomocí isoenzymových analýz, které představují soubor metod, s jejichž pomocí lze dokumentovat genetickou skladbu a variabilitu populací lesních dřevin na molekulární úrovni. Ta je dána výslednicí genotypové skladby porostu při jeho založení, působení stanovištních faktorů, které ovlivňují jak druhovou skladbu, tak i selekci různých genotypů v rámci druhu. Vzhledem k tomu, že geneticky podmíněná skladba reprodukčního materiálu rozhoduje o adaptabilitě, zdravotním stavu, produkci a kvalitě budoucích lesních porostů, je charakterizace genetické struktury významná mj. pro využití takto sledovaných populací jako zdroje reprodukčního materiálu. Volba sledovaných enzymatických systémů vychází z předchozích zkušeností s interpretací isoenzymových analýz nativních i syntetických populací této dřeviny.

Cílem práce je vyhodnocení genetických analýz vybrané mladší populace smrku ztepilého v oblasti Krkonoš na základě sledování enzymatických systémů G-6-PDH, GDH, SDH, PGM, MDH, IDH a AAT a stanovení základních genetických charakteristik. Součástí tohoto postupu je srovnání dosažených údajů s výsledky isoenzymových analýz této dřeviny u jiných populací, zejména v rámci různých přírodních lesních oblastí České republiky.

Přehled problematiky

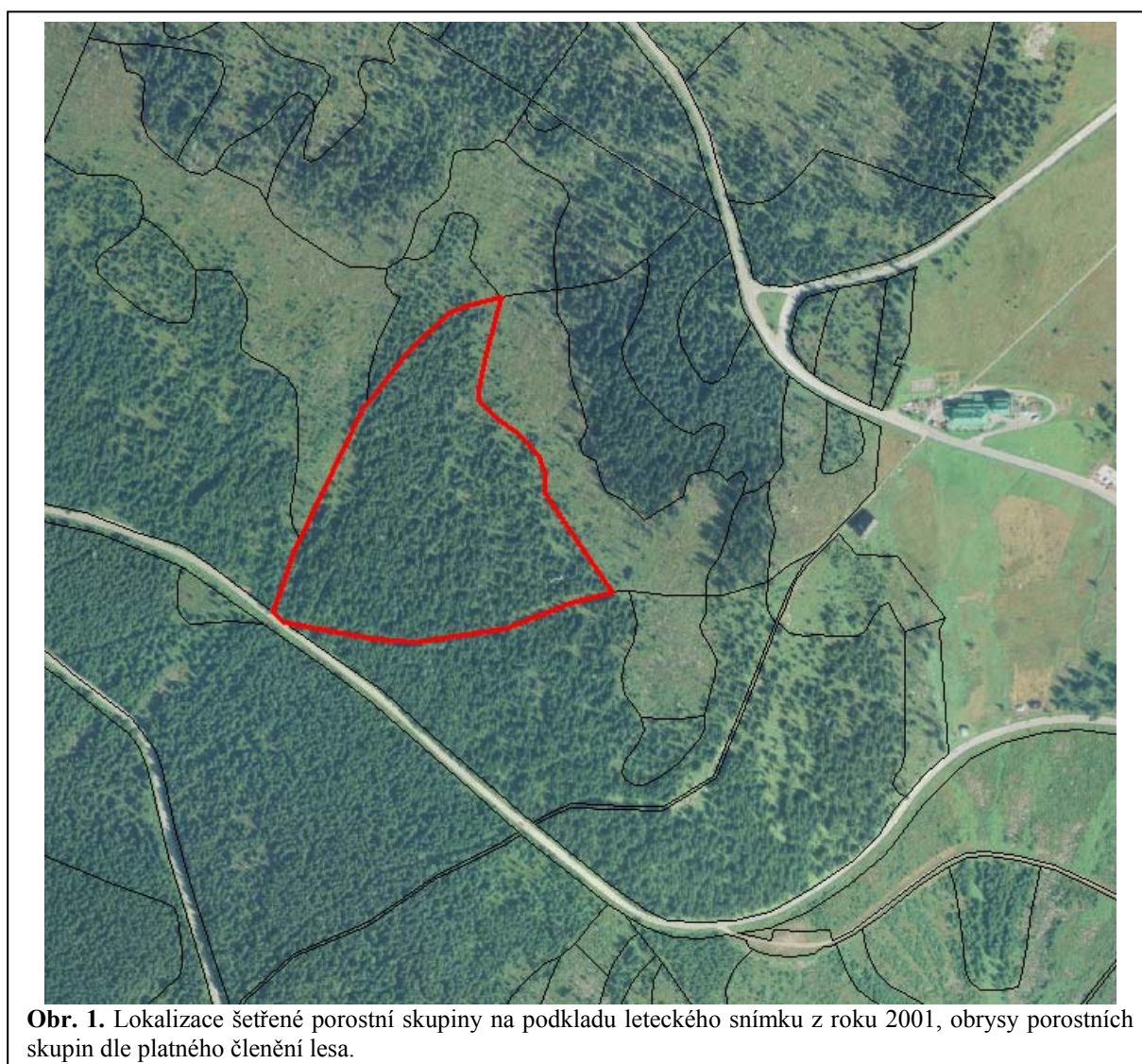
Genetický screening populací smrku ztepilého, prováděný na území České republiky pomocí isoenzymových analýz u 34 vybraných populací (IVANEK, 2000) a později na plochách ICP Forests v osmi různých přírodních lesních oblastech (IVANEK, 2006) ukázal na poměrně značnou variabilitu genetických charakteristik a výrazné rozdíly mezi autochtonními a allochtonními populacemi této dřeviny. Tyto výsledky dokumentovaly především velkou genetickou diferenciací populací smrku, a to i v případě, že pocházejí z geografických oblastí se srovnatelnou nadmořskou výškou a klimatickými podmínkami. K podobným závěrům došel např. LIESEBACH ET AL. (2001) a to přesto, že u porostů smrku lze navíc předpokládat horizontální i vertikální diferenciaci (LONGAUER ET AL., 2005). Hodnoty genetické diversity srovnatelné s těmi, které byly zjištěny u populací na plochách ICP-Forests s nejvyšším stupněm polymorfismu (u SDH-A a GDH), lze nalézt mezi populacemi z nejrůznějších typů porostů v SR, tj. takovými, které odpovídají porostům z umělé obnovy, přirozené obnovy i pralesům. Z výše uvedených poznatků vyplývá, že genetická skladba a diversita sledovaných populací je zřejmě v rozhodující míře dána původem, přesněji různorodostí reprodukčního materiálu při založení porostů a její vývoj je druhotně dán trvale probíhající selekcí genotypů, ovlivněnou stanovištními podmínkami. Systematickým sledováním populací smrku ztepilého na území ČR se zabýval rovněž MÁNEK (2003), který s využitím analýzy isoenzymů na základě studia 46 populací rovněž poměrně výrazně vylišil autochtonní populace a monokultury a pozoroval rovněž větší příbuznost autochtonních populací pocházejících z 8. LVS v porovnání s populací z nižšího vegetačního stupně – 5. až 6. LVS. Byly nalezeny některé téměř unikátní alely v populaci pocházející z NPR Boubínský prales. V dalších studiích se podobné znaky objevily také v několika dalších oblastech Šumavy (MÁNEK, 2003; MÁNEK, EŠNEROVÁ, 2007). Výzkum, který probíhal na populacích pocházejících z oblasti Krkonošského národního parku ukázal genetické odlišení smrku přirozeně rostoucího v 9. LVS. V roce 2000 byly publikovány výsledky genetických studií populací smrku pocházejících z oblasti Krkonoš a Krušných hor (IVANEK, 2000b, 2001). Sledovaní jedinci z Krkonoš pocházely z původních populací smrku z 8. LVS. Jedinci z Krušných hor pak pocházely z 6-7 LVS. Výsledky studie prokázaly signifikantní

rozdíl úrovně genetické variability, která byla vyšší u autochtonních populací pocházejících z oblasti Krkonoš. Detailní genetické mapování tří autochtonních populací smrku ztepilého bylo dále provedeno v oblasti Králického Sněžniku (IVANEK, 2005) a v oblasti Kladská (Karlovarská vrchovina) (IVANEK ET AL., 2007). Významnou práci, zabývající se využitím isoenzymových analýz při genetickém mapování populací smrku ztepilého představuje monografie KONNERT ET MAURER (1995), která charakterizuje výskyt alel na území střední Evropy pro 20 enzymatických systémů.

Materiál a metodika

Charakteristika vybrané populace

Vybraný porost je lokalizován v Krkonoších nad Špindlerovým Mlýnem, v rámci LHC Vrchlabí (platnost LHP 2003-2012) - jedná se o porostní skupinu 202F₄, aktuální stáří 39 let (2008). Přibližné souřadnice S-JTSK jsou x = 980080 m, y = 648425 m, nadmořská výška je přibližně 1080 m. Dále LHP uvádí složení porostu SM 99 %, JR 1 %, výška 7m, DBH 10 cm, zakmenění 9. Z typologického hlediska lze plochu zařadit do SLT 8N v kontaktu s 8V a to při dolní hranici 8. lesního vegetačního stupně. Dosud se tohoto porostu týkaly dva výchovné zásahy - prořezávka v roce 1995 a probírka v roce 2006. Dále je v rámci srovnávání plocha odkazována jako "Josefova bouda".



Odběr a zpracování vzorků

V období vegetačního klidu, tj. ve dnech 16. 4. a 29. 4. 2008, byly ve zvolené části porostu provedeny odběry vzorků větví smrku ztepilého (*Picea abies* Karst.) s dormantními pupeny. Odběr byl proveden ze všech, tj. 106

jedinců dané, prostorově ucelené části porostu. Větve byly uskladněny v plastických sáčcích při teplotě -20 °C do doby zpracování.

Isoenzymové analýzy

Z větví byly nejprve byly izolovány pupeny z 91 vzorků, které byly následně podrobeny extrakci enzymů homogenizací 5-10 mg rostlinného pletiva s 40-60 ml extrakčního pufru. Nižší počet zpracovávaných vzorků byl dán nedostatečnou velikostí pupenů a obtížemi při odběru jejich většího množství. Isoenzymy byly děleny jednorozměrnou horizontální elektroforézou na škrobovém gelu při 3 °C s použitím Tris-citrátového pufráčního systému. Dělení isoenzymů probíhalo na elektroforetické lince Multiphor II Pharmacia Biotech. Isoenzymové analýzy byly provedeny pro glukózo-6-fosfátdehydrogenázu (G-6-PDH), glutamátdehydrogenázu (GDH), šikimátdehydrogenázu (SDH), fosfoglukomutázu (PGM), isocitrátdehydrogenázu (IDH) a aspartátamino-transferázu syn. glutamátaloacetáttransferázu (AAT syn. GOT) a navíc, oproti původnímu návrhu modelu, malátdehydrogenáza (MDH) (tabulka 1). Bylo použito modifikovaných postupů isoenzymové extrakce, elektroforézy a barvicích postupů podle PASTEUR ET AL. (1988) a CHELIAKA ET PITTELA (1984). Zymogramy byly skenovány s využitím skeneru SHARP Scan JX-330 s adaptérem pro transparentní materiály a elektronicky archivovány.

Tabulka 1. Přehled sledovaných enzymatických systémů *Picea abies*.

Enzym	Zkratka	sledované lokusy
glukózo-6-fosfátdehydrogenáza	G-6-PDH	(A)
glutamátdehydrogenáza	GDH	(A)
šikimátdehydrogenáza	SDH	A
fosfoglukomutáza	PGM	A
malátdehydrogenáza	MDH	B, C
isocitrátdehydrogenáza	IDH	B
aspartátaminotransferáza	AAT	B, C

Zymogramy byly dále vyhodnoceny z hlediska identifikace jednotlivých klonů na základě shody či rozdílu mezi zastoupením jednotlivých genetických variant enzymů, resp. lokusů (alel). Základem vyhodnocení elektroforetických záznamů na gelu bylo relativní porovnání polohy proužků ztmavnutí (oblastí zvýšené optické hustoty), odpovídajících obarveným isoenzymům (pásům) s využitím speciálních výpočetních programů. Pásky byly klasifikovány podle vzestupného pořadí tříd relativní rychlosti migrace (RM) isoenzymů v elektrickém poli při jejich elektroforetické separaci na gelu, jež byly kvantifikovány pomocí programu ImageMaster (firma Pharmacia Biochem). Z rastrů s obrazem skenovaných gelů byly takto odečítány referenční hodnoty maxim optické hustoty, odpovídající hodnotě relativní rychlosti migrace (Rf) a to s použitím automatické procedury tohoto programu, zahrnující detekci pásů a odhad hodnot Rf. Série hodnot Rf pro každý gel byly exportovány do textového souboru, který slouží pro přenos dat do databáze programu IsoEnz. Základní zpracování výsledků na jednotlivých gelech bylo provedeno programem SeqAn, přičemž byla použita data načítaná z prostředí databáze IsoEnz (oba programy jsou produktem firmy IDS).

Vyhodnocení dat proběhlo ve dvou liniích, které byly výsledně porovnány.

(1) Numerické vyhodnocení v programu SeqAn je založeno na klasifikaci logaritmičticky transformovaných hodnot Rf do tříd RM samostatně pro soubor vzorků na každém z gelů. Výsledky klasifikace byly programem SeqAn zapsány do databáze IsoEnz. Řada vzorků byla opakována na dvou či více gelech - zkouška každého ze vzorků byla provedena dvakrát ve všech případech, kde bylo k dispozici dostatečné množství odebraného biologického materiálu, vždy s umístěním porovnávacího standardu na jeden gel. Díky opakování bylo umožněno exaktně porovnat klasifikace na různých zpracovávaných gelech, jak to umožňuje program IsoEnz. Jako základní kritérium optimalizace tohoto přiřazení bylo zvoleno průměrné (maximální) procento shody klasifikačních skupin u vzorků umístěných opakovaně na různých gelech.

(2) Vizualní vyhodnocení všech gelů proběhlo nezávisle. Jeho výsledkem je číselná kombinace přítomných alel pro každý vzorek. Alely byly označeny v pořadí vzrůstající pohyblivosti v elektrickém poli čísly 1, 2, 3, ... jako alelické páry (např. 12, 22, 23, atd.). Ve vzácném případě, kdy byla objevena některá vzácně se vyskytující alela s pohyblivostí nižší nežli má alela 1, byla výjimečně označena jako alela 0.

Nakonec bylo provedeno srovnání numerického a vizualního vyhodnocení, přičemž byla jedna nebo několik málo tříd RM identifikováno s každou jednou alelou. Při tomto porovnání mohly být objeveny a následně opraveny chyby v označení alel (alelických kombinací).

Po vlastním vyhodnocení a přiřazení alelických párů měřeným jedincům byly vypočteny hodnoty alelických frekvencí (relativní zastoupení zjištěných alel) a heterozygotnosti (relativní zastoupení heterozygotních jedinců).

Výsledky

Primárním experimentálním výstupem jsou zymogramy enzymatických systémů, které představují záznam isoenzymů rozdělených podle jejich vzájemně odlišné pohyblivosti v elektrickém poli při elektroforéze. Dosavadní výsledky umožňují stanovit genetickou konstituci u 91 jedinců smrku ztepilého; jsou uvedeny v Tabulce 2a (včetně opakovaných měření ve všech případech, kdy to dovozovalo dostatečné množství biologického materiálu). V pořadí zleva doprava jsou uvedeny pracovní kódy gelů (zymogramů), pořadová čísla na gelu (ID), čísla stromů a označení sledovaných enzymů s vyhodnocovaným lokusem. Prázdná políčka v tabulce představují případy, kdy nízká aktivita enzymů nedovolovala reprodukovatelný záznam na zymogramu. Výsledky isoenzymových analýz ukázaly relativně vysoký stupeň polymorfismu většiny sledovaných lokusů, které jsou zastoupeny počtem alel/genotypů, jež klesají v pořadí: 4/5 (SDH-A) > 2/3 (AAT-C) > 2/2 (G-6-PDH) ~ 2/2 (GDH) ~ 2/2 (IDH-B) > 1/1 (PGM-A) ~ 1/1 (AAT-B). Hodnoty heterozygotnosti sledovaných lokusů klesají v pořadí 0,424 (AAT-C) > 0,124 (G-6-PDH) ~ 0,122 (SDH-A) > 0,022 (GDH) > 0,011 (IDH-B) > 0 (PGM-A) ~ 0 (AAT-B).

Celou sledovanou populaci je možno rozdělit na skupiny jedinců se shodnými kombinacemi zastoupených alel v jednotlivých šetřených lokusech. Jedná se celkově o 28 takových skupin (Tabulka 2b). Hodnoty heterozygotnosti jsou uvedeny spolu s alelickými frekvencemi v Tabulce 3.

Tabulka 2a. Výsledky isoenzymových analýz sledovaného porostu *Picea abies*.

GEL	ID	Strom	G6PDH	GDH	SDH-A	PGM-A	MDH-B	MDH-C	IDH-B	AAT-B	AAT-C
S8J2	6	1	22	22	23	22	22	22	22	22	12
S8J4	18	2	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J3	14	3	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J2	14	4	12	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J4	12	7	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J2	12	10	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J2	17	11	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J1	7	12	22	22	03	22	22	22	22	22	12
S8J6	1	12	22	22	03	22	22	22	22	22	12
S8J4	4	13	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J6	2	14	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J7	16	14	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J5	3	15	22	22		22	22	22	22	22	11
S8J7	10	15	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J2	7	16	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J5	12	17	22	22	23	22	22	22	22	22	22
S8J2	8	19	12	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J1	18	20	22	22	33	22	22	23	22	22	11
S8J6	15	20	22	22	33	22	22	23	22	22	11
S8J3	15	21	12	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J7	8	21	12	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J4	14	22		22		22	22	22	22	22	
S8J4	19	23	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J2	9	24	22	22	33	22	22	22	22	22	
S8J7	14	26	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J3	10	27	22		33	22	22	22	22	22	12
S8J6	14	27		22	33	22	22	22	22	22	12
S8J2	4	28	22	22	33	22	22	22	12	22	12
S8J2	11	29	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J7	17	29	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J3	11	30	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J7	1	30	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J7	18	31	22	12	23	22	22	22	22	22	22
S8J3	12	33	22		33	22	22	23	22	22	12
S8J2	13	35	12	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J3	8	36	22	22	03	22	22	22	22	22	11
S8J4	5	39	22	22	33	22	22	23	22	22	22
S8J6	7	40	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J6	3	42	22	22	33	22	22	22	22	22	
S8J7	15	42	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J3	19	43	22	12	33	22	22	22	22	22	12

GEL	ID	Strom	G6PDH	GDH	SDH-A	PGM-A	MDH-B	MDH-C	IDH-B	AAT-B	AAT-C
S8J4	10	44	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J3	5	45	12	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J7	3	45	12	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J3	20	46	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J7	4	46	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J6	13	47	12	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J2	15	48	22	22	33	22	22	22	22	22	
S8J5	1	49	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J6	5	49	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J2	1	51	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J1	6	53	22	22	33	22	22	23	22	22	22
S8J7	5	53	22	22	33	22	22	23	22	22	22
S8J6	18	54	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J6	20	55	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J1	8	56	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J7	6	57	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J2	3	58	22	22	34	22	22	22	22	22	12
S8J1	10	59	22	22	33	22	12	22	22	22	22
S8J1	20	60	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J4	2	60	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J7	9	61	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J3	7	62	22	22	13	22	22	22	22	22	11
S8J6	8	62	22	22	13	22	22	22	22	22	11
S8J2	2	63	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J5	6	63	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J1	4	64	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J1	12	64	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J3	1	65	22		33	22	22	22	22	22	12
S8J5	19	65	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J2	19	66	12	22	33	22	22	22	22	22	
S8J3	9	66		22	33	22	22	22	22	22	11
S8J2	20	67	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J5	13	67	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J1	1	69	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J6	10	69	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J1	15	70	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J5	20	70	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J2	10	71	12	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J6	11	71	12	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J6	12	72	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J7	11	72	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J4	1	73	22	22	33	22	22	22	22	22	
S8J3	3	74	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J5	7	75	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J3	16	76	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J1	17	77	12	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J6	4	78	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J4	15	79	22	22	34	22	22	22	22	22	12
S8J1	13	81	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J3	6	82	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J1	11	83	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J1	3	84	22	22	33	22	22	33	22	22	22
S8J6	16	85	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J6	17	86	12	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J3	17	87	22		33	22	22	22	22	22	11
S8J3	18	88	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J5	8	89	22	22	23	22	22	22	22	22	12
S8J4	9	90	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J1	2	91	22	22	33	22	22	22	22	22	11

GEL	ID	Strom	G6PDH	GDH	SDH-A	PGM-A	MDH-B	MDH-C	IDH-B	AAT-B	AAT-C
S8J3	4	91	22		33	22	22	22	22	22	11
S8J1	14	92	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J5	15	93	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J1	16	94	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J5	16	94	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J4	3	95	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J5	2	95	22	22	33	22	22	22	22	22	11
S8J1	5	96	22	22	23	22	22	22	22	22	11
S8J5	11	96	22	22	23	22	22	22	22	22	11
S8J4	6	97	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J4	16	97	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J4	13	98	12	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J5	9	99	22	22	33	22	22	23	22	22	11
S8J5	17	99	22	22	33	22	22	23	22	22	11
S8J5	5	100	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J6	6	100	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J4	8	101	22	22	33	22	22	22	22	22	22
S8J4	11	102	22	22	03	22	22	22	22	22	12
S8J7	13	102	22	22	03	22	22	22	22	22	12
S8J5	18	104	22	22	23	22	22	22	22	22	12
S8J7	19	104	22	22	23	22	22	22	22	22	12
S8J4	20	105	22	22	33	22	22	22	22	22	12
S8J2	18	106	22	22	34	22	22	22	22	22	12
S8J7	20	106	22	22	34	22	22	22	22	22	12
S8J5	10	107	22	22	33	22	22	22	22	22	11

Tabulka 2b. Frekvence výskytu stromů s určitými alelickými kombinacemi pro sledované lokusy. Celkový počet stromů v této tabulce je nižší, protože u některých stromů nebyly identifikovány alelické páry pro všechny lokusy.

G6PDH	GDH	SDH-A	PGM-A	MDH-B	MDH-C	IDH-B	AAT-B	AAT-C	Počet
22	22	33	22	22	22	22	22	11	14
22	22	33	22	22	22	22	22	12	14
22	22	33	22	22	22	22	22	22	12
22	22	23	22	22	22	22	22	12	6
22	22	33	22	22	22	22	22	01	5
12	22	33	22	22	22	22	22	12	3
22	22	34	22	22	22	22	22	12	3
12	22	23	22	22	22	22	22	12	2
12	22	33	22	22	22	22	22	22	2
22	22	03	22	22	22	22	22	12	2
22	22	23	22	22	22	22	22	11	2
22	22	33	22	22	22	22	22	02	2
22	22	34	22	22	22	22	22	11	2
12	22	23	22	22	22	22	22	22	1
12	22	33	22	22	22	22	22	01	1
12	22	33	22	22	22	22	22	02	1
12	22	33	22	22	22	22	22	11	1
22	12	23	22	22	22	22	22	12	1
22	12	33	22	22	22	22	22	12	1
22	22	03	22	22	22	22	22	11	1
22	22	13	22	22	22	22	22	11	1
22	22	23	22	12	22	22	22	22	1
22	22	23	22	22	22	22	22	22	1
22	22	33	22	22	22	12	22	12	1
22	22	33	22	22	23	22	22	11	1
22	22	33	22	22	23	22	22	12	1
22	22	33	22	22	23	22	22	22	1
22	22	34	22	22	23	22	22	11	1
									84

Tabulka 3. Hodnoty alelických frekvencí a heterozygotnosti zjištěné u sledovaného porostu smrku ztepilého.

	Lokus								
	G-6-PDH	GDH	SDH-A	PGM-A	MDH-B	MDH-C	IDH-B	AAT-B	AAT-C
Frekvence:									
alela 0			0,017						0,052
alela 1	0,062	0,011	0,006		0,005		0,005		0,511
alela 2	0,938	0,989	0,083	1,000	0,995	0,973	0,995	0,995	0,437
alela 3			0,861			0,027		0,005	
alela 4			0,033						
Heterozygotnost	0,124	0,022	0,278	0,000	0,011	0,055	0,011	0,011	0,506

Diskuse

Výsledky isoenzymových analýz sledované populace smrku ztepilého na lokalitě Josefova bouda se pohybují v rámci obvyklém pro populace této dřeviny. To se týká počtu alel na lokus i genetické diversity, jejímž měřítkem je heterozygotnost. Heterozygotnost isoenzymového lokusu s nejvyšším polymorfismem, tj. AAT-C je typická pro středoevropské populace smrku ztepilého, kde se frekvence alel 1 a 2 pohybují v rozmezí 0,4 až 0,6 (KONNERT ET MAURER, 1995). Nicméně zjištěná heterozygotnost tohoto lokusu patří mezi sledovanými populacemi k nejvyšším. Pokud se týká enzymatického systému G-6-PDH, zjištěná frekvence minoritní alely se pohybuje v rozmezí do hodnoty 0,2 typické pro populace smrku obecně. Pozorovaná heterozygotnost je srovnatelná s hodnotami zjištěnými u některých ploch ICP Forests, např. Q 511 v PLO 3 Karlovarská vrchovina nebo I 140 v PLO 10 Středočeská pahorkatina. Je podstatně vyšší, než u populace smrku ztepilého sledované v oblasti Kladské nebo v oblasti Sněžky (IVANEK, 2006; IVANEK ET AL., 2007). Podobné srovnání je možno formulovat u lokusu SDH-A, jehož frekvence minoritních alel se ve středoevropském měřítku pohybují v rozmezí 0 až 0,15. Alela 0 (nejedná se o tzv. nulovou alelu, viz metodika) byla v rámci sledovaných populací smrku v ČR identifikována poprvé a odpovídá velmi vzácné alele tohoto lokusu, o níž referuje např. KONNERT ET MAURER (1995) pod označením SDH-A6. Hodnoty heterozygotnosti SDH-A u sledované populace Špindlerův mlýn jsou srovnatelné s hodnotami zjištěnými v lokalitě Prales ve Strmém v PLO 27 Králický Sněžník nebo na ploše N 120 v PLO 15 Jihočeské pánve (Tabulka 4). Při tomto porovnání je ovšem třeba vzít v úvahu, že v případě lokality Josefova bouda se jedná o podstatně mladší porost než u lokalit ostatních. U ostatních lokusů, tj. GDH, PGM-A a IDH-B jsou polymorfismus a heterozygotnost relativně nízké. Zastoupení minoritních alel je však typické pro středoevropské populace smrku ztepilého, tj. pro GDH < 0,03, pro PGM 0 až 0,2 a pro IDH-B < 0,05. Hodnoty pro AAT-B nejsou v tomto srovnání uvedeny vzhledem k velmi nízkému polymorfismu tohoto lokusu.

Tabulka 4. Hodnoty heterozygotnosti zjištěné u 18 výzkumných ploch a populací smrku ztepilého v různých přírodních lesních oblastech (PLO). Bližší údaje k plochám ICP-Forests viz IVANEK (2006), pro plochy z oblasti Králického Sněžníku (Prales ve Strmém až Pod Frantovou chatou; interní označení ID₀=51) viz IVANEK (2005), Kladská viz IVANEK ET AL. (2007). Výsledky z dvou ploch na území Krkonoš dosud nebyly publikovány (interní označení I - ID₀=62, II - ID₀=63).

Plocha	PLO	SLT	G-6-PDH	GDH	SDH-A	PGM-A	MDH-B	MDH-C	IDH-B	AAT-C
ICP-Forests: H 100	10	2H/2I	0,000	0,000	0,033	0,000				
ICP-Forests: C 140	23	4S	0,000	0,000	0,033	0,000				
ICP-Forests: B 130	21	6K	0,000	0,000	0,100	0,000				
ICP-Forests: Q 521	3	6K	0,075	0,000	0,030	0,000				
ICP-Forests: N 120	15	5R	0,000	0,000	0,133	0,000				
ICP-Forests: Q 551	16	5O	0,080	0,020	0,080	0,020				
ICP-Forests: O 101	12	5K	0,000	0,000	0,222	0,022				
ICP-Forests: Q 511	3	4K	0,136	0,000	0,000	0,114				
ICP-Forests: Q 561	16	5K	0,000	0,078	0,000	0,176				
ICP-Forests: I 140	10	3K	0,115	0,019	0,269	0,058				
ICP-Forests: E 190	25	7P/7K	0,200	0,133	0,200	0,033				
Prales ve Strmém	27	7S	0,145		0,118	0,053				0,408
Vlaštovčí skály	27	8N	0,227		0,160	0,013				0,400
Pod Frantovou chatou	27	8K	0,173		0,080	0,027				0,400
Kladská	3		0,076	0,038	0,077	0,007				0,543
Sněžka - Lví Důl I	23	8K	0,091	0,036	0,164	0,078	0,027	0,130	0,036	0,509
Sněžka - Lví Důl II	23	8K	0,104	0,010	0,094	0,052	0,000	0,073	0,063	0,589
Josefova bouda	23	8N	0,124	0,022	0,278	0,000	0,011	0,055	0,011	0,506

Závěr

S využitím isoenzymových analýz byla sledována genetická diversita porostu v Krkonoších nad Špindlerovým Mlýnem, LHC Vrchlabí, stáří 39 let, z něhož bylo odebráno 106 vzorků, analyzováno 91 vzorků. Výsledky isoenzymových analýz tohoto porostu pro isoenzymové lokusy bylo analyzováno 91 vzorků pro enzymatické systémy G-6-PDH, GDH, SDH, PGM, IDH a AAT ukázaly relativně vysoký stupeň polymorfismu většiny sledovaných lokusů, které jsou zastoupeny počtem alel/genotypů, jež klesají v pořadí: 4/5 (SDH-A) > 2/3 (AAT-C) > 2/2 (G-6-PDH) ~ 2/2 (GDH) ~ 2/2 (IDH-B) > 1/1 (PGM-A) ~ 1/1 (AAT-B). Hodnoty heterozygotnosti sledovaných lokusů klesají v pořadí 0,424 (AAT-C) > 0,124 (G-6-PDH) ~ 0,122 (SDH-A) > 0,022 (GDH) > 0,011 (IDH-B) > 0 (PGM-A) ~ 0 (AAT-B). Výsledky isoenzymových analýz sledované populace smrku ztepilého v oblasti Špindlerův mlýn se pohybují v rámci obvyklém pro populace této dřeviny z hlediska srovnání v celoevropském měřítku i z hlediska vybraných populací, sledovaných v ČR v různých přírodních lesních oblastech.

Předkládané výsledky poskytují základ pro vyhodnocení genetické variability sledované populace v prostoru i jako podklad pro možné vyhodnocení potenciálního vlivu různých modelových výchovných zásahů na změnu genetické struktury populace.

Literatura

- CHELIAK, W. M., PITEL, J. A. (1984): Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. - Petawawa National Forestry Inst., Canadian Forestry Service, Agriculture Canada.
- IVANEK, O. (2000a): Využití isoenzymových analýz v lesnictví. - Lesnická práce, 79: 542-544.
- IVANEK O. (2000b): Genetic study of Norway spruce from the northern part of Czech republic with using isoenzyme analyses. - Comm. Inst. For. Boh./Práce VÚLHM, 19: 15-23.
- IVANEK O. (2001): Isoenzymové analýzy smrku ztepilého na plochách ICP Forest v PLO Karlovarská vrchovina. In: Slodičák M., Novák J. [eds.], Výsledky lesnického výzkumu v Krušných horách v roce 2001. Sborník z celostátní konference, Teplice 14.3.2002. - VÚLHM VS Opočno, pp. 155-160.
- IVANEK O. (2005): Vyhodnocení izoenzymových analýz smrku ztepilého z NPR Králický Sněžník. - Ms. [Výzk, zpráva, VÚLHM]
- IVANEK O. (2006): Výsledky izoenzymových analýz populací smrku ztepilého na plochách s různými stanovištními podmínkami. - Zprávy lesnického výzkumu, 51: 32-37
- IVANEK, O., NOVOTNÝ, P., KAROUS, M., GÜRTLER, R. (2007): Porovnání genetické struktury porostních skupin smrku ztepilého v CHKO Slavkovský les na stanovištích odlišných z hlediska přítomnosti tektonických poruch v podloží. - Zprávy lesnického výzkumu, 52: 328-333
- KONNERT, M., MAURER, W. (1995): Isozymic Investigations on Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and European Silver Fir (*Abies alba* Mill.): A Practical Guide to Separation Methods and Zymogram Evaluation. - Bayerische Landesanstalt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht Teisendorf.
- LIESEBACH, M., KONIG, A.O., UJVÁRI-JÁRMAY, E. (2001): Provenance-environment interactions of norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) on German and Hungarian test sites. In: MULLER-STARCK, G., SCHUBERT, R. (eds), Genetic response of forest systems to changing environmental conditions, - Kluwer Academic Publishers, London, pp. 353-363
- LONGAUER, R., GÖMÖRY, D., PAULE, L., KARNOSKY, D.F., MAŇKOVSKÁ, B., MÜLLER-STARCK, G., PERCY, K., SZARO, R. (2001): Selection effects of air pollution of Norway spruce, European silver fir and European beech. - Environmental Pollution, 115: 405-411.
- MÁNEK J. (2003): Výzkum genofondu lesních dřevin v ČR – výsledky isoenzymové laboratoře NP Šumava. - Ochrana přírody, 58(3): 70-74.
- MÁNEK J., EŠNEROVÁ, J. (2007): Studium genetické variability a ověřování původnosti smrkových populací v Národním parku Šumava jako podklad pro záchranná managementová opatření. In: Dvořák L., Šustr P., Braun V. [eds.], Aktuality šumavského výzkumu III. Sborník z konference. Srní 4. – 5. 10. 2007. - Správa Národního parku a Chráněné krajinné oblasti Šumava, Vimperk, pp. 87-89.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J., BRITTON-DAVIDIAN, J. (1988): Practical Isozyme Genetics. Ellis Horwood series in gene technology. - Wiley & Sons, New York.