

Razvoj molekularne baze podatkov za smreko in možnost razlikovanja treh provenienc na podlagi molekularnih markerjev

Development of molecular database for Norway spruce and the possibility of distinguishing three provenances on the basis of molecular markers

Marjana PUČKO¹, Gregor BOŽIČ², Hojka KRAIGHER³

Izvleček:

Pučko, M., Božič, G., Kraigher, H.: Razvoj molekularne baze podatkov za smreko in možnost razlikovanja treh provenienc na podlagi molekularnih markerjev. *Gozdarski vestnik* 63/2005, št. 9. V slovenščini, z izvlečkom in povzetkom v angleščini, cit. lit. 26. Prevod v angleščino: avtorji. Lektura angleškega besedila Jana Oštir.

Predstavljen je začetek razvoja molekularnih baz podatkov na primeru smreke s pomočjo STS in EST molekularnih markerjev. Analizirali smo 3 provenience smreke (Leskov grm, Hrušica, Konačnik). Markerji so se izkazali kot potencialno primerni za razlikovanje provenienčnih območij vendar bi bilo potrebno z molekularnimi analizami raziskati večje število vzorcev, da bi lahko potrdili obstoječo razmejitev provenienčnih območij na osnovi ekoloških kriterijev. Za boljše moč razlikovanja med posameznimi proveniencami in identifikacijo posameznikov ter učinkovito kontrolo nad pridobivanjem gozdnega reprodukcijskega materiala bo potrebna nadgradnja baze z bolj polimorfnimi markerji.

Ključne besede: smreka, *Picea abies* L. (Karst.), gozdni reprodukcijski material, molekularni markerji, molekularna baza podatkov

Abstract:

Pučko, M., Božič, G., Kraigher, H.: Development of molecular database for Norway spruce and the possibility of distinguishing three provenances on the basis of molecular markers. *Gozdarski vestnik*, Vol. 63/2005, No. 9. In Slovene, with abstract and summary in English, lit. quot. 26. Translated into English by the authors. English language editing by Jana Oštir.

The introductory development of molecular databases with STS and EST DNA markers is presented on the example of 3 provenances of Norway spruce (Leskov grm, Hrušica, Konačnik). The selected DNA markers proved to be potentially suitable for the discrimination of provenance regions. However, analyses of more samples are needed throughout Slovenia to confirm the existing ecologically based delineation of provenance regions. Expanding the database with the use of more polymorphic markers is necessary to increase the capability of discriminating between different provenances and individuals.

Key words: Norway spruce, *Picea abies* L. (Karst.), forest reproductive material, molecular markers, molecular database

1 UVOD

1 INTRODUCTION

Krajevna populacija je množica osebkov iste drevesne vrste v nekem ekološko enotnem prostoru, ki s cvetenjem in semenenjem oblikujejo genetsko svojevrstnost kot rezultat prilagajanja danemu okolju. V gozdnem semenarstvu moramo upoštevati krajevne populacije z njihovo genetsko svojevrstnostjo, da se lahko izognemo napačnemu izboru porekla semena za dano rastišče. Zato je seme potrebno pridobivati iz ustreznih semenskih virov. Genetska variabilnost omogoča populaciji ekološko prilagodljivost na spremenjene razmere okolja in je tako pogoj za preživetje. Pri nabiranju semena je zato potrebno zajeti dovolj veliko genetsko variabilnost, kar zahteva nabiranje semena na

večjem številu dreves in na večji gozdni površini. Velja splošna smernica, da naj bi se seme nabiralo z najmanj 25 semenskih dreves, ki so med seboj zadosti oddaljena in domnevno nesorodna (SCHMIDT 2000). Število dreves, s katerih naj bi se seme pridobivalo v Sloveniji, je na podlagi strokovne ocene navedeno v odločbi za odobritev gozdnega semenskega objekta, izdani na podlagi Zakona o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002), Pravilnika o seznamu drevesnih vrst in

¹ M.P. univ. dipl. inž. gozd. Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

² Dr. G. B. Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

³ Doc. dr. H.K. Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

umetnih križancev (2002), Pravilnika o pogojih za odobritev gozdnih semenskih objektov v kategorijah "znano poreklo" in "izbran" ter o seznamu gozdnih semenskih objektov (2003) in Pravilnika o določitvi provenienčnih območij (2003).

Na podlagi Pravilnika o potrilih in glavnih spričevalih za gozdni reprodukcijski material (2004) mora odgovorna strokovna oseba dobavitelja, ki spremlja pridobivanje reprodukcijskega materiala v gozdnem semenskem objektu, dnevno posredovati pooblaščenim osebam za nadzor (Gozdarski inštitut Slovenije - GIS) vzorec semenskega materiala od vsakega drevesa, s katerega se je semenski material pridobil in sicer za vrste iz rodu *Picea* po 1 storž na drevo. Ti vzorci postanejo del slovenske gozdne genske banke in so kot referenčni vzorci namenjeni za potrebe molekularne identifikacije gozdnega reprodukcijskega materiala (GRM), sledljivosti GRM in genetske analize populacij. Podatki o DNA zapisu posameznih osebkov so shranjeni v molekularni bazi podatkov, katere skrbnik je GIS.

Genetski markerji, kamor uvrščamo tudi molekularne ali DNA markerje, so dedni polimorfni znaki, ki neposredno odražajo spremembe v zaporedju DNA na nukleotidni ravni ali posredno na ravni genske ekspresije (SCHUBERT et al. 2001). DNA markerji niso podvrženi vplivom okolja, so potencialno številčno neomejeni in predstavljajo objektivno mero variacije. Poleg možnosti identifikacije posameznikov omogočajo tudi vpogled v genetsko strukturo posameznih populacij in so pomembno orodje za preučevanje genetske diverzitete, migracijskih poti in odnosov med osebki znotraj in med populacijami. Hkrati omogočajo oceniti, ali je določena mešanica semena (partija), pridobljena iz odobrenega gozdnega semenskega objekta, tudi z genetskega

vidika (nevarnost inbridinga) primerna za setev ali sadnjo v gozdovih.

Zadosti polimorfni molekularni markerji omogočajo na podlagi pridobljenih referenčnih vzorcev s posameznih semenskih dreves identifikacijo vira semena in števila dreves, ki prispevajo seme v posamezno partijo. Kot najboljši markerji za identifikacijo in analizo starševstva so se izkazali mikrosateliti (tandemske ponovitve DNA krajše od 150 bp z enoto ponovitve 1 do 6 bp). Obstajajo študije za hraste (DOW / ASHLEY 1996, LEXER et al. 1999), jelko (CREMER et al. 2003) in kostanjeve kultivarje (BOTTA et al. 2004). Za smreko (*Picea abies* L. (Karst.)) je prišlo do pospešenega razvoja mikrosatelitov v zadnjih letih (SCOTTI et al. 2002a, SCOTTI et al. 2002b, BESNARD et al. 2003), vendar le-ti še niso bili uporabljeni za analize naravnih populacij smreke. V Sloveniji smo se poizkusno odločili za sistem izgradnje molekularne baze podatkov z STS («sequence tag site» - kratka zaporedja DNA, ki so lahko prepoznavna in se nahajajo le na enem mestu v genomu) in EST («expressed sequence tag» - polimorfizem izraženega kodirajočega genomskega zaporedja) markerji, ki so manj polimorfni od mikrosatelitov, vendar je njihova analiza enostavnejša in ekonomsko ugodnejša.

2 METODE 2 METHODS

Analizirali smo 3 provenience smreke, ki so pripadale izbranim gozdnim semenskim objektom na Mašunu (Leskov grm), Hrušici (Hrušica) in Pohorju (Konačnik).

Za ekstrakcijo DNA iz klice posameznega semena, ki je pripadal določenemu drevesu,

Preglednica 1: Izvor in kratek opis vzorcev
Table 1: Origin and short description of the samples

Provenienca	Leskov grm	Hrušica	Konačnik
Identifikacijska številka semenskega objekta	6.0131	6.0137	2.0173
Provenienčno območje	Dinarsko	Dinarsko	Pohorsko
Nadmorska višina	850-900	750-800	850-900
Izvor	neavtohton (2. generacija)	avtohton	neznan
Velikost vzorca	57	30	39

smo uporabili DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemčija) z manjšimi modifikacijami protokola proizvajalca (dodatek PVP in aktivnega oglja). Za PCR-RFLP smo uporabili pare začetnih oligonukleotidov ali primerjev (temperatura vezave primerjev v °C) Sb17 (57), Sb42 (56), Sb51 (55), Sb58 (57), Sb70 (57) (PERRY / BOUSQUET 1998), PA0002 (55) and PA0055 (55) (SCHUBERT et al. 2001) v kombinaciji z restrikcijskimi encimi AluI, AfaI, HaeIII in DraI. PCR-RFLP produkte smo z gelsko elektroforezo ločili na 2% agaroznem gelu in jih opazovali v UV območju s pomočjo obarvanja z etidijevim bromidom.

Za vsako provenienco smo izračunali najnižjo frekvenco alelov v demu, ki jih z vzorci dane velikosti zasledimo (GREGORIOUS 1980). Izračunali smo frekvence alelov in genotipov, gensko diverziteto in fiksacijski indeks F_{IS} . Hipotezo o naključnem združevanju gamet (odklone od Hardy-Weinbergovega ravnotežja) smo preverili s Hardy-Weinbergovim eksaktnim testom po HALDANU (1954; cit. po RAYMOND / ROUSSET 1995). Gre za verjetnostni test, v katerem je verjetnost opaženega vzorca uporabljena za definicijo območja zavrnitve hipoteze. Za testiranje ničelne hipoteze ob upoštevanju vseh lokusov znotraj populacije smo uporabili Fisherjevo metodo (GenePop). Stopnja genetske diferenciacije med proveniencami je bila kvantificirana kot Neijeva genetska razdalja (NEI 1972), ki je mera števila alelnih sprememb na lokus in temelji na frekvencah genov. Izračunali smo tudi genetsko razdaljo po WRIGHTU (1978).

Izračunali smo oceno za verjetnost identitete P_{ID} po formuli (PAETKAU et al. 1995):

$$P_{ID} = \sum_i p_i^2 + \sum_{i \neq j} (2p_i p_j)^2$$

kjer so p_i in p_j frekvence i -tih in j -tih alelov.

Da bi preverili, ali lahko s pomočjo genetske razdalje določiš izvor neznanega vzorca (pripadnost domnevni provenienci), smo s pomočjo slučajnostnih števil za vsako provenienco simulirali po 3 vzorce, ki naj bi pripadali neznani partiji semena. Izračunali smo skupne genetske razdalje (NEI 1972, WRIGHT 1987) in uporabili UPGMA metodo (metoda nepondirane aritmetične sredine) za prikaz grupiranja vzorcev.

Izračuni kazalcev za uporabo v populacijski genetiki so bili narejeni s programi TFPGA (MILLER 1997), GenePop (RAYMOND / ROUSSET 1995) in Fstat (GOUDET 2002).

3 REZULTATI

3 RESULTS

3.1 Primernost izbranih molekularnih markerjev

3.1 Usefulness of selected molecular markers

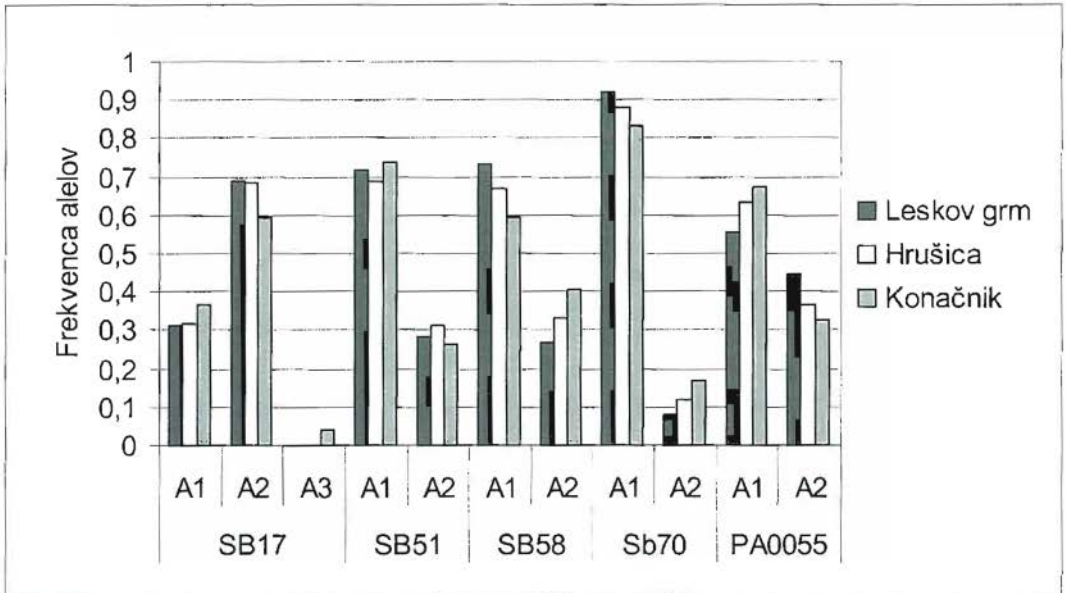
Od sedmih uporabljenih markerjev jih je bilo za nadaljnjo analizo primernih 5. Njihova povprečna stopnja uspešnosti PCR je bila 0,90. Zaradi neuspešnega pomnoževanja kljub optimizaciji pogojev PCR (zniževanje temperature vezave primerjev, spremembe koncentracije reagentov) smo iz nadaljnje analize izključili lokus PA0002. Neuspešnost pomnoževanja je verjetno posledica izpada, vnosa ali zamenjave nukleotida na mestu vezave primerja. Lokus Sb42 smo iz obdelave podatkov izključili zaradi velikega števila heterodupleksov, ki so se pojavljali na tem lokusu. S kombinacijo preostalih 5 parov primerjev smo odkrili 37 različnih genotipov. Osebk brez določenega genotipa na enem lokusu smo pri določanju celotnega genotipa izločili.

Preglednica 2: Verjetnost identitete P_{ID}

Table 2: Probability of identity P_{ID}

Provenienc	Leskov grm	Hrušica	Konačnik	Skupaj
P_{ID}	0,023	0,018	0,013	0,018

Ocena verjetnosti identitete P_{ID} pove, kakšna je verjetnost da imata 2 naključno izbrana osebk identični genotip. S kombinacijo 5 lokusov Sb17, Sb51, Sb58 Sb70 in PA0055 je ta verjetnost za posamezno populacijo med 0,013 in 0,023. Vrednost 0,013 pomeni, da v 987 primerih od 1.000 razločimo dve naključno izbrani drevesi iz populacije. Vrednost P_{ID} dobljena z izoenzimskimi genskimi markerji pri jelki z analizo 11 polimorfnih lokusov v Nemčiji je znašala 0,043 (CREMER et al. 2003). V raziskavi, ki je omogočila individualno identifikacijo kanadskih medvedov z analizo jedrnih mikrosatelitov, je bila



Grafikon 1: Prikaz frekvence alelov na posameznem genskem lokusu za provenience smreke Leskov grm, Hrušica in Konačnik
 Graph 1: Allele frequencies on individual gene loci for Norway spruce provenances Leskov grm, Hrušica and Konačnik

vrednost P_{ID} velikostnega reda 10^{-7} (PAETKAU et al. 1995). Verjetnost identitete, dobljena s STS in EST markerji za proučevane populacije smreke v Sloveniji je previsoka, da bi lahko omogočila individualno identifikacijo osebkov.

3.2 Genetske analize provenienc 3.2 Genetic analyses of provenances

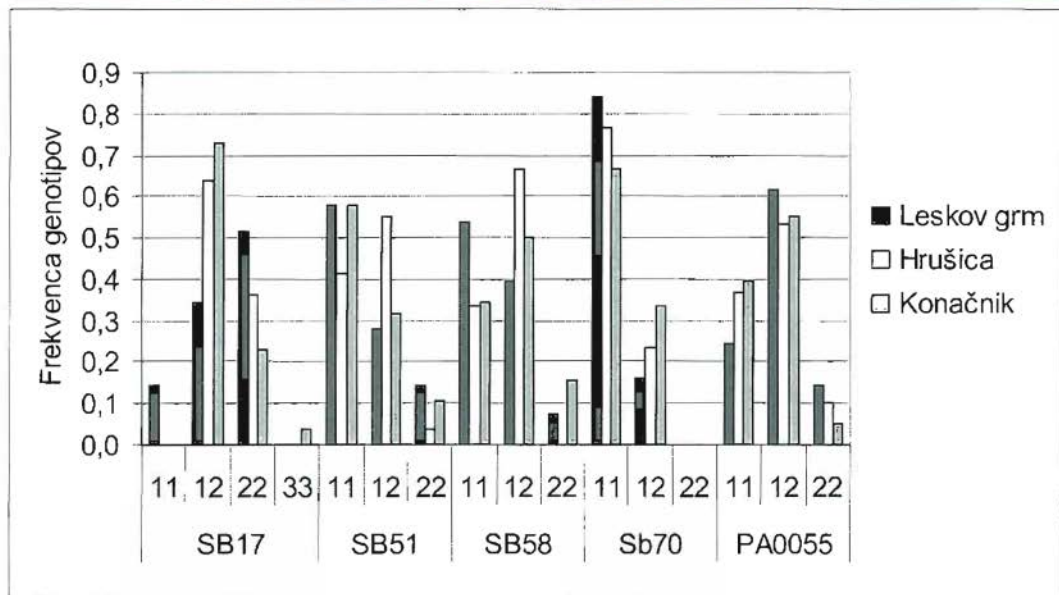
Alelna ali genska frekvenca je mera pogostnosti določenega alela v populaciji. Od analiziranih lokusov se je za najbolj informativnega izkazal lokus Sb17, kjer smo v provenienci Konačnik zasledili alel A3, ki ni bil prisoten v ostalih dveh proveniencah (grafikon 1). Ob predpostavki, da je populacija v Hardy-Weinbergovem (HW) ravnotežju, smo pri provenienci Leskov grm, ki jo predstavlja vzorec velikosti 57, z verjetnostjo 0,95 zasledili vse alele, ki se v populaciji pojavljajo s frekvenco večjo ali enako 0,05, pri provenienci Hrušica s frekvenco večjo ali enako 0,09, pri provenienci Konačnik pa 0,07. Sklepamo lahko, da je alel A3 značilen za provenienco Konačnik. Da bi to potrdili, bi bilo potrebno analizirati še nekaj provenienc iz istega provenienčnega območja. V primeru, da se alel A3 ne bi pojavil v nobeni od

ostalih provenienc, bi bil nedvoumen kazalec za provenienco Konačnik.

Na podlagi frekvenc genotipov smo izračunali gensko diverzitetu oziroma pričakovano heterozigotnost (H_E) glede na HW ravnotežje in jo primerjali z opaženo oziroma dejansko heterozigotnostjo (H_O), ki predstavlja število heterozigotov v vzorcu. Genska diverzitetata pove, koliko variacije obstaja v populaciji in kako je le-ta razporejena. Opažena genska diverzitetata H_O je bila najmanjša za lokus Sb70 (med 0,15 za provenienco Leskov grm in 0,28 za provenienco Konačnik) in največja za lokus Sb17 (0,44 za provenienci Leskov grm in Hrušica in 0,51 za provenienco Konačnik), ki je tudi najbolj informativen.

Preglednica 3: Prikaz koeficientov inbridinga (F_{IS}) na petih genskih lokusih in skupaj za 3 vzorčene provenience smreke
 Table 3: Inbreeding coefficient (F_{IS}) at 5 gene loci and combined for 3 sampled Norway spruce provenances

	Leskov grm	Hrušica	Konačnik
SB17	0,218	-0,448	-0,418
SB51	0,313	-0,273	0,199
SB58	0,007	-0,478	-0,022
Sb70	-0,078	-0,115	-0,188
PA0055	-0,233	-0,132	-0,239
Skupaj	0,052	-0,308	-0,145



Grafikon 2: Prikaz frekvenc genotipov na posameznih genskih lokusih za provenience smreke Leskov grm, Hrušica in Konačnik.

Graph 2. Genotype frequency on individual gene loci for Norway spruce provenances Leskov grm, Hrušica and Konačnik

Fisherjev eksaktni test, s katerim smo testirali ničelno hipotezo o naključnem združevanju gamet (HW ravnotežje), je pokazal, da vzorčena provenienca Konačnik odstopa od HW ravnotežja ($p = 0,005$), kar je posledica prisotnosti alela A3 na lokusu Sb17. Alel A3 se je pojavil le v enem osebku in sicer v homozigotnem stanju. Zaradi unikatnosti homozigota z alelom A3 smo identifikacijo tega osebka ponovili in dobili enak rezultat. Za ostale lokuse ničelne hipoteze pri tveganju 0,05 nismo mogli zavrniti. Odstop od HW ravnotežja je bil značilen tudi za lokus Sb51 pri provenienci Leskov grm ($p = 0,024$), vendar hipoteze o naključnem združevanju gamet ne moremo zavrniti ($p = 0,247$) ob upoštevanju rezultatov vseh štirih lokusov.

Na podlagi heterozigotnosti smo izračunali F-statistiko, ki je statistično orodje za oceno variacije v frekvencah genov. F_{IS} ali koeficient inbridinga ocenjuje variacijo v posameznikih relativno na variacijo v subpopulacijah. V primeru pozitivne vrednosti gre za pomanjkanje heterozigotov, kar nakazuje na oploditev med sorodniki. Koeficient inbridinga je povezan z medsebojno razdaljo dreves, s katerih se seme nabira, saj verjetnost, da so drevesa sorodna, pada z večanjem razdalje med

semenskimi drevesi. Če je v semenskem sestoju in/ali v semenski mešanici prisoten večji primanjkljaj heterozigotov (inbriding), je potrebno pretehtati, ali je tak sestoj sploh primeren za semenski objekt in ali je partija primerna za nadaljnjo uporabo semena v gozdarstvu.

Na podlagi analize petih lokusov skupaj vidimo, da je za semenska drevesa za provenienci Hrušica in Konačnik prisoten presežek ($F_{IS} < 0$), za provenienco Leskov grm pa manjši primanjkljaj heterozigotov ($F_{IS} > 0$). Ker je primanjkljaj heterozigotov blizu vrednosti 0, je seme nabrano iz semenskih dreves primerno za nadaljnjo uporabo GRM. V primeru velikega F_{IS} lahko posumimo, da je bilo seme nabrano z dreves, ki rastejo eden ob drugem (npr. šopi), ne pa z dreves, ki so med seboj oddaljena za 1 do 2 drevesni višini, kar velja za splošno smernico pri pridobivanju GRM.

3.3 Razlikovanje posameznikov in provenienc

3.3 Differentiation of individuals and provenances

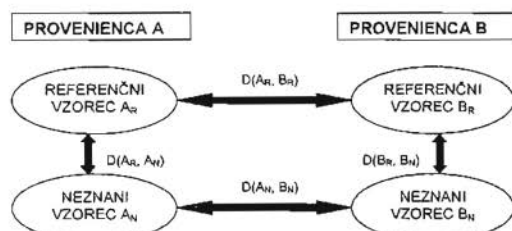
Razlike med proveniencami smo kvantificirali z merilom genske razdalje, ki povzame frekvence alelov v skupno mero diferenciacije za pare

Preglednica 4: Genetska razdalja izračunana po Nei in Wrightu

Table 4: Nei's and Wright's genetic distance

	Nei						Wright
	Sb17	Sb51	Sb58	Sb70	PA0055	Skupaj	Skupaj
Leskov grm - Hrušica	0,00	0,13	0,64	0,10	1,22	0,41	5,10
Leskov grm - Konačnik	0,87	0,04	3,22	0,61	2,55	1,51	9,74
Hrušica - Konačnik	0,79	0,32	0,98	0,22	0,24	0,56	5,87

populacij. Genetska razdalja med referenčnim vzorcem provenienc A in neznanim vzorcem iste provenienc naj bi bila manjša kot genetska razdalja med referenčnima vzorcema dveh različnih provenienc (A in B) oziroma kot genetska razdalja med referenčnim vzorcem provenienc



Slika 1: Prikaz odnosa genetskih razdalj (D) med vzorci različnih provenienc in med različnimi vzorci iste provenienc

Figure 1: Genetic distance (D) relationships for samples originating from the same provenience and from different proveniences

A in neznanim vzorcem, ki izhaja iz provenienc B (slika 1) (KONNERT 2004, osebna komunikacija).

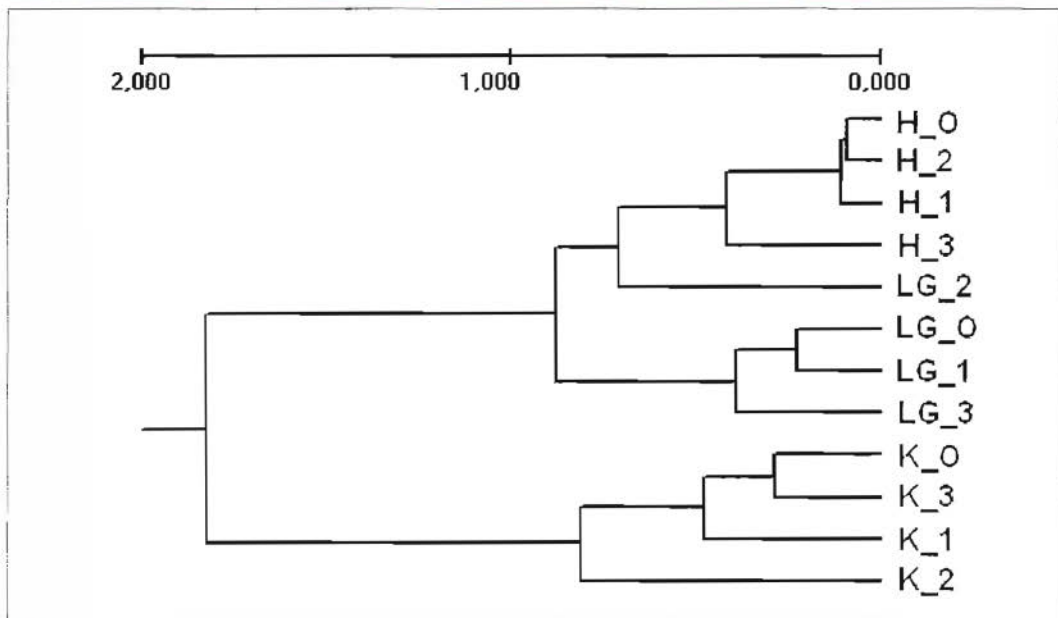
Skupna genetska razdalja med proveniencama smreke Leskov grm in Hrušica, ki pripadata istemu provenienčnemu območju, je manjša kot skupna genetska razdalja med proveniencama Leskov grm in Konačnik ter Hrušica in Konačnik, ki pripadata različnim provenienčnim območjem. Z Neijevo genetsko razdaljo se ujema tudi Wrightova genetska razdalja (preglednica 4). Dobljeni rezultat potrjuje primernost razdelitve Slovenije na provenienčna območja tudi z genetskega vidika.

Čeprav je mešanica semena v partiji nabrana z dreves, s katerih smo pridobili referenčne vzorce (1 storž na drevo), z naključnim izborom vzorca partije frekvence alelov na posameznem genskem lokusu ne bodo enake kot v referenčnem vzorcu, ker vsako drevo prispeva različno količino semena

Preglednica 5: Genetske razdalje med vzorci; pod diagonalo je Neijeva genetska razdalja, nad diagonalo Wrightova

Table 5: Genetic distances among samples; Nei's genetic distance below diagonal and Wright's above diagonal

	LG_O	LG_1	LG_2	LG_3	H_O	H_1	H_2	H_3	K_O	K_1	K_2	K_3
LG_O		3,76	6,10	4,30	5,10	4,98	4,60	6,91	9,74	13,41	11,30	11,18
LG_1	0,22		9,64	5,46	7,70	7,03	6,55	8,04	11,69	15,94	11,89	13,07
LG_2	0,60	1,49		8,53	5,11	6,57	6,84	7,58	8,83	9,87	11,87	9,12
LG_3	0,30	0,47	1,18		8,09	8,43	7,20	9,91	11,82	15,18	13,67	13,60
H_O	0,41	0,93	0,43	1,06		2,73	2,31	4,36	5,87	9,79	9,24	7,69
H_1	0,40	0,79	0,69	1,14	0,10		2,52	5,85	7,76	12,21	10,50	9,83
H_2	0,34	0,68	0,77	0,84	0,09	0,10		5,07	6,46	11,32	9,37	8,99
H_3	0,74	0,99	0,94	1,59	0,31	0,52	0,41		5,34	9,06	5,98	5,55
K_O	1,51	2,18	1,28	2,28	0,56	0,93	0,66	0,49		6,11	5,81	4,05
K_1	2,93	4,16	1,58	3,83	1,59	2,39	2,11	1,41	0,64		8,97	4,17
K_2	2,08	2,27	2,36	3,09	1,43	1,78	1,45	0,61	0,57	1,38		5,37
K_3	2,00	2,74	1,35	3,04	0,97	1,51	1,31	0,52	0,28	0,31	0,48	



Slika 2: Dendrogram narejen z UPGMA metodo na podlagi Nejevih genetskih razdalj. Oznake so enake kot pri preglednici 5.

Figure 2: Dendrogram based on Nei's genetic distance made with UPGMA method. Denotations are the same as in table 5.

v partijo. Za pridobitev ocene o primernosti uporabe genetske razdalje kot merila pripadnosti naključno vzetega vzorca partije referenčnemu vzorcu, smo za vsako provenienco z uporabo slučajnostnih števil simulirali po 3 vzorce velikosti 50, ki predstavljajo naključno vzete vzorce iz partije. Isto slučajnostno število je predstavljalo zaporedno številko genetskega profila posameznega osebka in se je lahko ponovilo. Izračunane genetske razdalje med pari provenienc in simuliranih vzorcev prikazuje preglednica 5.

LG... Leskov grm, H... Hrušica, K... Konačnik

O... izvorni vzorec (*original sample*); 1, 2, 3... simulirani vzorci na podlagi slučajnostnih števil (*simulated samples based on random numbers*).

Opazna je razlika v genetski razdalji med proveniencama iz dinarskega provenienčnega območja (Leskov grm, Hrušica) in provenienco Konačnik s pohorskega provenienčnega območja. Genetska razdalja, izračunana na podlagi uporabljenih molekularnih markerjev, ni zadosti informativna, da bi na podlagi le te mogli trditi,

da neznani vzorec izhaja iz provenienc Leskov grm ali Hrušica, omogoča pa ugotovitev, da vzorec izvira iz dinarskega ali pohorskega provenienčnega območja. Drevo, dobljeno z uporabo UPGMA metode, prikaže rezultate v bolj pregledni grafični obliki (slika 2). Jasno ločimo dva grozda za dinarsko in pohorsko provenienčno območje, medtem ko ločitev med proveniencama Leskov grm in Hrušica ni zadosti jasna.

4 DISKUSIJA

4 DISCUSSION

Molekularne baze podatkov omogočajo spremljavo genetske variabilnosti znotraj in med različnimi populacijami v času in prostoru. Z uporabo zadosti polimorfni in informativni markerjev so dober pripomoček pri nadzoru pridobivanja GRM. Na Gozdarskem inštitutu Slovenije smo se odločili za izgradnjo molekularne baze podatkov z uporabo STS in EST markerjev, ki jih za izgradnjo baze podatkov uporabljajo tudi na Bavarskem. Ti markerji omogočajo neposredno primerljivost genetske variabilnosti populacij in GRM, kar je potrebno v primeru proste trgovine z GRM.

Na podlagi ugotovitev analize treh populacij s sedmimi markerji smo ugotovili, da je pet markerjev potencialno primernih za osnovanje molekularne baze podatkov, v katero je potrebno vključiti dodatne DNA markerje, kot so mikrosateliti, ter nove EST in STS markerje za doseganje večje ločljivosti posameznikov in provenienc.

Pomemben kazalec primernosti izbire semenskih dreves je koeficient inbridinga, ki v primeru pozitivne vrednosti nakazuje na oploditev med sorodniki. Inbriding lahko povzroči znatno zmanjšanje ravnosti prizadetih osebkov. Pri smreki so ugotovili, da parjenje med sorodstveno bolj oddaljenimi osebki zmanjša prirastek volumna debla za 7%, parjenje med bližnjimi sorodniki pa za 28% (ERIKSSON / EKBERG 2001). Zato je izbira semenskih dreves z zadostno medsebojno razdaljo nujna, pregled z genetskimi markerji pa nam omogoči potrditev primernosti semenskega materiala za uporabo v gozdarstvu.

Za kvantifikacijo razlik med proveniencami / populacijami se je dobro izkazala genetska razdalja. BOŽIČ et al. (2003) so na podlagi analize genetskih razdalj z izoencimskimi genskimi markerji pri smreki ugotovili, da je potrebno populacije osrednjega dinarskega fitogeografskega območja ločevati od populacij alpskega fitogeografskega območja. Na podlagi analize 3 provenienc iz dveh provenienčnih območij smo z DNA markerji ugotovili, da se populacija iz pohorskega območja jasno loči od populacij iz dinarskega območja. Rezultati obeh raziskav tudi potrjujejo primernost razdelitve Slovenije na provenienčna območja oziroma delitev na dinarsko in nedinarsko (alpsko, pohorsko) območje. Za ostala provenienčna območja trenutno še ni na voljo podobnih genetskih raziskav.

S simulacijo smo pokazali, da lahko določeno partijo semena uvrstimo v provenienčno območje, ne moremo pa ločiti dveh partij, ki pripadata dvema proveniencama znotraj istega provenienčnega območja. DNA markerji, ki bi omogočili analizo dodatnih lokusov, bi povečali moč razlikovanja med posameznimi proveniencami. Zato bomo izgradnjo baze nadaljevali z uporabo novih EST markerjev in mikrosatelitov, ki naj bi zaradi večje polimorfnosti omogočili tudi

identifikacijo posameznih osebkov in tako neposreden nadzor nad številom dreves, ki prispevajo seme v posamezno partijo.

Zaradi ohranjanja prilagoditvenega potenciala populacij gozdnih drevesnih vrst v prihodnosti je nujno zagotoviti široko genetsko osnovo GRM. Molekularne baze omogočajo oceno genetske variabilnosti v naravnih populacijah in spremljavo primernosti GRM za nadaljnjo uporabo v gozdarstvu. Za popolno učinkovitost trenutne baze molekularnih podatkov pa je le-to potrebno razširiti z uporabo dodatnih DNA markerjev in analizo večjega števila populacij.

5 POVZETEK

Molekularne baze podatkov omogočajo spremljavo genetske variabilnosti znotraj in med različnimi populacijami v času in prostoru. Z uporabo zadosti polimorfnih in informativnih markerjev so dober pripomoček pri nadzoru pridobivanja GRM. Na GIS smo se odločili za izgradnjo molekularne baze podatkov z uporabo STS in EST markerjev.

Genetski profil osebkov je bil določen s PCR-RFLP z vizualizacijo na agaroznem gelu s pari primerjev Sb17, Sb51, Sb58, Sb70 in PA0055 v kombinaciji z restriktivnimi encimi AluI, AfaI, HaeIII in DraI. Referenčne vzorce, ki predstavljajo posamezno provenienco, smo opisali z genetskimi kazalci (frekvenca alelov, frekvenca genotipov, verjetnost identitete P_{ID} , odklon od HW ravnotežja, genska diverziteteta, fiksacijski indeks F_{IS} , genetska razdalja). S slučajnostnimi števili smo simulirali vzorce, ki naj bi pripadali partiji semena in s pomočjo genetskih razdalj ugotavljali pripadnost vzorcev partij referenčnim vzorcem.

Za najbolj informativnega se je izkazal lokus Sb17. Odklon od HW ravnotežja je bil prisoten v provenienci Konačnik zaradi prisotnosti homozigota z unikatnim alelom. Presežek heterozigotov je bil opažen pri proveniencah Hrušica in Konačnik, majhen deficit pa pri provenienci Leskov grm. Genetska razdalja med dinarskima proveniencama je bila manjša kot med njima in pohorsko provenienco. S pomočjo simuliranih vzorcev treh provenienc smo ugotovili, da lahko vzorec iz partije povežemo z dinarskim ali pohorskim provenienčnim območjem ne pa s provenienco samo.

Zaradi ohranjanja prilagoditvenega potenciala populacij gozdnih drevesnih vrst v prihodnosti je nujno zagotoviti široko genetsko osnovo GRM. Molekularne baze omogočajo oceno genetske variabilnosti v naravnih populacijah in spremljavo primernosti GRM za nadaljnjo uporabo v gozdarstvu. Za popolno učinkovitost trenutne baze molekularnih podatkov pa je le-to potrebno razširiti z uporabo dodatnih DNA markerjev in analizo večjega števila populacij.

6 SUMMARY

Molecular databases enable the monitoring of genetic variability within and among different populations in time and space. The use of informative polymorphic markers is a good tool for controlling forest reproductive material (FRM) acquisition. At the Slovenian Forestry Institute we decided to establish a molecular database for Norway spruce with the use of STS and EST markers.

PCR-RFLP (Sb17, Sb51, Sb58, Sb70 and PA0055 in combination with restriction enzymes AluI, AfaI, HaeIII in DraI) with agarose gel electrophoresis was used to determine the genetic profile of individuals in the reference samples. Allele and genotype frequencies, probability of identity, deviations from Hardy-Weinberg (HW) equilibrium, gene diversity, F_{15} and genetic distances were calculated. With the help of random numbers seedlot samples were simulated to see whether genetic distances could be used to link the seedlot sample to the reference samples and thus determine their origin.

Sb17 turned out to be most informative of the examined loci. Deviations from the HW equilibrium were present in the Konačnik provenance due to one homozygote with a unique allele. An excess of heterozygotes was present in the Hrušica and Konačnik samples, while a small deficit was noted for the Leskov grm sample. The genetic distance for samples belonging to the same provenance region was smaller than the genetic distance of these two samples from the Pohorje provenance region sample. Simulations showed that seedlot samples could be linked to the Dinaric or to the Pohorje provenance region but not to an individual provenance – based on the data from five loci.

A broad genetic base of FRM is necessary to safeguard the adaptation potential of a species. Molecular databases enable evaluation of genetic variability in natural populations and suitability of FRM. For our database to become fully operational, additional polymorphic loci and a large number of populations shall need to be examined.

7 VIRI

7 REFERENCES

- BESNARD, G. / ACERE, 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, s. 380-383.
- BOTTA, R. / TORELLO MARIONI, D. / BOUNOUS, G., 2004. Molecular markers and certification. – V: *Proceedings from the Workshop Biotechnologia Forestal, Global biotechnology forum, Concepcion, Chile, 2.-5. 3. 2004*, s. 63-73
- BOŽIČ, G. / KONNERT, M. / ZUPANČIČ, M. / KRAIGHER, H., 2003. Genetska diferenciacija avtohtonih populacij smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji, ugotovljena z analizo izoencimov.- *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 71, s. 19-40
- CREMER, E. / LIEPELT, K. / ZIEGENHAGEN, B. / HUSSENDÖRFER, E., 2003. Microsatellite and isozyme markers for seed source identification in silver fir.- *Forest Genetics*, 10, 3, s. 165-170.
- DOW, B.D. / ASHLEY, M.V., 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*.- *Mol Ecol*, 5, s. 615-627
- GREGORIOUS, H.R., 1980. The probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled. *Biometrics* 36:632-652
- ERIKSSON, G. / EKBERG, I., 2001. *An Introduction to Forest Genetics*. Uppsala, SLU Repro, 166 s.
- GOUDET, J., 2002. *Fstat*, verzija 2.9.3.2. URL: <http://www2.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>
- KONNERT, M. 2004. Molekularne baze na Bavarskem, ASP Teisendorf, Teisendorf, Nemčija (1.4.2004)
- LEXER, C. / HEINZE, B. / STEINKELLNER, H. / KAMPFER, S. / ZIEGENHAGEN, B. / GLÖSSL, J., 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring.- *Theor Appl Genet*, 99, s. 185-191.
- MILLER, M.P., 1997. *Tools for population genetic analysis*. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona (verzija 1.3).

- NEI, M., 1972. Genetic distance between populations. - *Am. Nat.* 106:283-292
- PAETKAU, D. / CALVERT, W. / STIRLING, I. / STROBECK, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. - *Molecular Ecology*, 4, s. 347-354.
- PERRY, D. J. / BOUSQUET, J., 1998. Sequence-Tagged-Site (STS) Markers of Arbitrary Genes: Development, Characterisation and Analysis of Linkage in Black Spruce. - *Genetics*, 149, s. 1089-1098.
- Pravilnik o določitvi provenienčnih območij. - *Ur.l. RS* 72/2003.
- Pravilnik o pogojih za odobritev gozdnih semenskih objektov v kategorijah "znano poreklo" in "izbran", ter o seznamu gozdnih semenskih objektov. - *Ur.l. RS* 91/2003.
- Pravilnik o potrdilih in glavnih spričevalih za gozdni reprodukcijski material. - *Ur.l. RS* 19/2004.
- Pravilnik o seznamu drevesnih vrst in umetnih križancev. - *Ur.l. RS* 83/2002.
- RAYMOND, M. / ROUSSET, F., 1995. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249 (verzija 3.4)
- SCHMIDT, L., 2000. Genetic implications of seed handling. - In: *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*, Danina Forest Seed Centre. s. 511
- SCHUBERT, R. / MUELLER-STARCK, G. / RIEGEL, R., 2001. Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulation genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. - *Theor Appl Genet*, 103, s. 1223-1231.
- SCOTTI, I. / MAGNI, F. / PAGLIA, G. / MORGANTE, M., 2002b. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. - *Theor Appl Genet*, 106, s. 40-50.
- SCOTTI, I. / PAGLIA, G. / MAGNI, F. / MORGANTE, M., 2002a. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. - *Theor Appl Genet*, 104, s. 1035-1041.
- WEIR, B.S. / COCKERHAM, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4: Variability within and among Natural Populations*. Chicago: University of Chicago Press
- Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu. - *Ur.l. RS* 58/2002, 45/2004.