

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

**OBOR ROSTLINNÉ BIOTECHNOLOGIE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Morfologická a genetická variabilita  
v populacích *Gymnadenia conopsea* agg.**

**Bc. PAVLA KOLOUŠKOVÁ**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

2010



Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum.....

Podpis studenta .....

Abstrakt:

**Morfologická a genetická variabilita v populacích *Gymnadenia conopsea* agg.**

Klíčová slova: *Gymnadenia conopsea* agg., morfologická variabilita, genetická variabilita, cytogenetická variabilita

Komplex *Gymnadenia conopsea* s.l. reprezentuje taxonomicky velmi problematickou skupinu vykazující širokou morfologickou, fenologickou, genetickou a cytogenetickou variabilitu. Agregát *G. conopsea* zahrnuje řadu taxonů, z nichž dva *G. conopsea* (L.) R. Br. s.s. a *G. densiflora* (Wahlenb.) A. Dietr., jsou uznávané na úrovni druhu. Jednotlivé taxony nelze vždy bezpečně odlišit pouze na základě morfologických znaků.

V poslední době se vede mnoho debat o taxonomické hodnotě taxonů v rámci komplexu *G. conopsea*. Komplex je za stoupen mnoha cytotypy, přičemž majoritní tetraploidní cytotypy reprezentují výše zmíněné taxony *G. conopsea* a *G. densiflora*, které je možné cytometricky spolehlivě odlišit. Taxonomické zařazení minoritních cytotypů je nejasné. Z těchto důvodů je pro hodnocení populací vhodné uplatnění různých přístupů z oblasti morfologie, cytogenetiky a molekulární genetiky pro získání detailnějších informací.

V této práci byly pro hodnocení použity morfologické charakteristiky, molekulární markery AFLP a analýza mikrosatelitů společně s měřením ploidní úrovně pomocí FCM. Na základě vyhodnocení vícerozměrné shlukové analýzy a dendrogramu sestrojeného metodou UPGMA kombinující tato data, byla potvrzena druhová odlišnost taxonu *G. densiflora* od *G. conopsea*. Ze srovnávaných analýz mikrosatelitních lokusů a překrývajících se morfometrických charakteristik tetraploidního a oktoploidního cytotypu *G. conopsea* lze usuzovat, že je oktoploidní cytotyp oddělenou chromozomální aberací tetraploidních rostlin.

Abstract:

**Morphological and genetical variability in populations of *Gymnadenia conopsea* agg.**

Keywords: *Gymnadenia conopsea* agg., morphological variability, genetical variability, cytogenetical variability

The complex *Gymnadenia conopsea* s.l. represents a very problematic group in terms of taxonomy, showing a wide morphological, phenological, genetical and cytogenetical variability. The aggregate *G. conopsea* encompasses a range of taxa, two of which, *G. conopsea* (L.) R. Br. s.s. and *G. densiflora* (Wahlenb.) A. Dietr., have been acknowledged as being a species level. Individual taxa cannot be safely distinguished on the basis of morphological characteristics in all cases.

Recently, there has been a lot of discussion concerning the taxonomical value of taxons within the *G. conopsea* complex. The complex is represented by a variety of cytotypes, while the major tetraploid cytotypes represent the above mentioned *G. conopsea* and *G. densiflora* taxa, that are easily distinguishable by means of flow cytometry. The taxonomical classification of minority cytotypes is not clear. For these reasons, to be able to obtain more detailed information, an application of different approaches from the field of morphology, cytogenetics and molecular genetics is suitable when evaluating the populations.

In this thesis, morphological characteristics, AFLP and an analysis of microsatellites along with a measurement of ploid level using FCM have been used for evaluation. On the basis of evaluating a multidimensional cluster analysis and a dendrogram created by the UPGMA method combining these data, a specific dissimilarity of the *G. densiflora* and *G. conopsea* taxon has been confirmed. Based on the comparative analysis of microsatellite loci and overlapping morphometric characteristics of tetraploid and octoploid *G. conopsea* cytotype it can be assumed that the octoploid cytotype is a separate chromosomal aberration of tetraploid plants.

V první řadě chci poděkovat Ing. Barboře Kubátové, Ph.D. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za kvalitní odborné vedení, cenné rady a čas věnovaný mé práci a osobě. Poděkování patří též celému kolektivu labořatoře Biotechnologického centra ZF JČU.

V neposlední řadě chci vzdát dík mým rodičům za trpělivost a tichou, ale významnou podporu v průběhu mého dosavadního studia.

Autorské prohlášení.

Diplomová práce je součástí výzkumu v rámci řešného grantu Biotechnologického centra ZF JCU. Z tohoto důvodu nejsou v předkládané elektronické verzi uvedeny výsledky. Plné znění je obsaženo pouze v archivovaném originále uloženém v knihovně ZF JU.

Autor: Pavla koloušková

## Obsah:

1. Úvod	...8
2. Literární přehled	...9
2.1. Charakteristika agregátu <i>Gymnadenia conopsea</i> s. l.	...9
2.2. Taxonomická a nomenklatorická problematika komplexu <i>G. conopsea</i>	...12
2.3. Genetická a cytogenetická variabilita komplexu <i>G. conopsea</i>	...15
2.4. Molekulární markery	...17
2.4.1. Metody použité v této práci	...18
2.4.1.1. Dominantní marker: AFLP	...18
2.4.1.2. Kodominantní marker: SSRs	...18
2.4.1.3. Průtoková cytometrie	...19
2.5. Morfologické versus molekulární markery	...19
3. Materiál a metody	...21
3.1. Charakteristika analyzovaných populací	...21
3.2. Morfologické charakteristiky	...21
3.3. Průtoková cytometrie	...22
3.4. Izolace DNA	...22
3.5. Analýza molekulárních markerů	...23
3.5.1. AFLP	...23
3.5.2. Mikrosatelity	...26
3.6. Popis použitých metod hodnocení	...28
4. Výsledky	...29
5. Diskuze	...35
6. Závěr	...38
7. Seznam použité literatury	...39
8. Přílohy	...45



## 1. Úvod:

V současné době se ve studiu rostlinných populací začínají uplatňovat nové metodologické přístupy a molekulární techniky k hodnocení a zpracování dat, které vedou k lepšímu pochopení jejich struktury a řeší otázky na úrovni vnitro a mezipopulační variability. V minulosti se na rostlinné populace pohlíželo jako na celek a podle toho byly i hodnoceny, v současné době se pohled změnil a populace jsou zkoumány na úrovni souborů individuálních rostlin, a zároveň je zdůrazněn význam jedince a jeho vlivu na chování a parametry populace.

V této diplomové práci jsem sklobila několik metodických přístupů kombinující morfologická, cytogenetická a molekulární data pro detailnější posouzení vnitro a mezi populační variability v rámci komplexu *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.

Cílem předkládané diplomové práce je posoudit úroveň vnitro a mezi populační variability a vyhodnotit korelaci mezi morfologickou, genetickou a cytogenetickou variabilitou u 10 modelových populací komplexu *G. conopsea* za použití analýzy vybraných morfologických znaků, molekulárních markerů a cytogenetického skríningu. Vybrané populace záměrně reprezentují tři hlavní taxony a to tetraploidní *G. conopsea*, tetraploidní *G. densiflora* a oktoploidní rostliny spadající pod *G. conopsea*.

## 2. Literární přehled:

### 2.1. Charakteristika agregátu *Gymnadenia conopsea* s.l.:

*Orchidaceae* je bezesporu nejrozsáhlejší čeledí jednoděložných rostlin, celá čeleď odhadem zahrnuje 20.000 druhů, někteří autoři uvádějí až 25.000, rozdělených přibližně do 800 rodů (Pridgeon et al., 1999, 2001; Nilsson, 1992; Dressler, 1993). Charakteristickým rysem orchidejí jsou květy, jejichž morfologie naznačuje blízké ekologické a evoluční vazby zapříčiněné rozsáhlým počtem opylovačů - bezobratlých i obratlovců (Box et al., 2008). Květy orchidejí mají specializovanou stavbu se silnou vazbu na opylovače a mnoho vztahů mezi rostlinou a opylovačem je druhově specifických (Van der Pijl a Dodson, 1966). V sympatrických populacích, kde se doba kvetení rostlin může překrývat, může specializace na opylovače působit jako prezygotický izolační mechanismus rozmnožování (Van der Pijl a Dodson, 1966; Dressler, 1993).

Rod *Gymnadenia* (*Orchidaceae*), pětiprstka (fragrant orchid), patří mezi terestrické orchideje geograficky rozšířené v celé Eurasijské oblasti (Gustafsson a Thorén, 2001). Rod zahrnuje přibližně 20 druhů (Pridgeon et al., 1997) a je blízce příbuzný rodu *Dactylorhiza* s nímž tvoří hybridní mezidruhové formy (Bateman a Farrington, 1989; Stace, 1997). Tak jako u jiných terestrických orchidejí, tak i u rodu *Gymnadenia* zaznamenáváme symbiotické vztahy s mykorhizními houbami (Harvais a Hadley, 1967). Potenciálně široké spektrum mykorhizních hub tvořících symbiotické vztahy s orchidejemi pravděpodobně zapříčiňuje schopnost těchto rostlin osidlovat různá prostředí s jejich specifickým mikrobiálním složením (Stark et al., 2009).

Jak již bylo zmíněno výše, výskyt rodu *Gymnadenia* je zaznamenán téměř v celém Evropském areálu (Moore, 1980). Rod je rozšířen od nížinných oblastí až po subalpínské louky (Reinhard et al, 1991) a jeho výskyt je významně vázán na agroekosystémy, nalézáme ho na otevřených pastvinách, v oblastech spásaných a subalpínských luk, v blízkosti mokřadů a bažin. Pokles počtu populací v posledních dekádách má souvislost s destrukcí těchto biotopů a změnami v systému hospodaření s nimi (Gustafsson a Thorén, 2001). Celkové rozšíření rodu zaujímá Evropu, od britských ostrovů a Skandinávie na severu, až po střeozemí na jihu (zde však

roste pětprstka dosti vzácně, převážně jen na horách), dále malou Asii a Kavkaz až po oblasti jižně od Kaspického moře a Írán. Z evropské části bývalého SSSR zasahují druhy rodu *Gymnadenia* přes Ural na Sibiř a odtud až na Dálný východ, do Číny a Japonska. V českých zemích roste pětprstka v nížinách vzácně, v hornatějších oblastech roztroušeně, místy až hojně (např. v Krkonoších, Orlických horách, Beskydech, Bílých Karpatech) (Procházka a Velíšek, 1983).

Komplex *G. conopsea* s.l. vykazuje širokou variabilitu v morfologii, fenologii, genetických a karyologických znacích napříč oblastmi výskytu (např. Jongpierová a Jongpier, 1989; Marhold et al., 2005; Campbell et al., 2007).

Rostliny *G. conopsea*, *G. densiflora* a *G. borealis* (vyjma *G. odoratissima*) nelze vždy bezpečně odlišit díky jejich morfologické variabilitě v rámci jednotlivých populací (Campbell et al. 2007). V práci Gustafsson a Lönna (2003) byla u *G. conopsea* a *G. densiflora* nalezena morfologická shodnost. V současné práci Jersáková et al. (2010) byly nalezeny průkazné morfologické rozdíly v délce ostruhy mezi tetraploidní a oktoploidní *G. conopsea* a mezi *G. densiflora*. Není však zcela zřejmé zda má odlišnost v délce ostruhy u pětprstky vliv na oddělené opylení v smíšených populacích.

Autoři se též liší v názorech na zařazení *G. conopsea*, *G. densiflora* a *G. borealis* do taxonů a označují je jako ekotypy (Scacchi a Angelis, 1989), poddruhy (Stace, 1997) nebo druhy (Bateman et al., 1997; Pridgeon et al., 1997; Bateman, 2006). Scacchi a Angelis (1989) ve své práci detekovali „suché a vlhké“ ekotypy, které by mohly naznačovat význam prostředí a ekotypům propůjčovat taxonomický význam. Názor, že se mohou odlišné taxony nebo odlišné cytotypy v komplexu *G. conopsea* lišit v ekologických nárocích sdílí ve své práci také Marhold et al. (2005).

V rámci druhů vyskytujících se ve střední Evropě jsou dva druhy lišící se fenologií kvetení, morfologií a karyologií, schopné tvořit smíšené, sympatrické populace a to: *G. conopsea* agg. (doba kvetení - květen až červenec) a *G. densiflora* (doba kvetení - červenec až srpen) (Reinhard et al., 1991; Soliva a Widmer, 1999). Podle dostupných informací v literatuře a vlastního zjištění uvádí Jersáková et al. (2010) jasně odlišenou dobu kvetení u tetraploidní *G. conopsea* v květnu až červenci a u *G. densiflora* a oktoploidních rostlin spadajících do agregátu *G. conopsea* v červenci a srpnu. Dále uvádí, že mezi oktoploidní *G. conopsea* ( $2n=80$ )

a tetraploidní *G. densiflora* ( $2n=40$ ), které mají stejnou dobu kvetení, může docházet k toku genů (což je podpořeno sporadickým výskytem hexaploidních rostlin), avšak jsou zde zřejmě pre a post zygotické mechanismy omezující tvorbu hybridních semen / rostlin. Mezi tetraploidní *G. conopsea* a výše zmíněnými cytotypy k toku genů nedochází díky odlišné době kvetení.

Květenství pětiprstky se vyznačuje výraznou vůní, která láká opylovače (*Lepidoptera*) shromažďující nektar z květů (Van der Cingel, 1995). Vůně bývá jedním z faktorů, podle kterého jsou rostliny pozorovatelem sensoricky identifikovány. Diploidní a tetraploidní rostliny *G. conopsea* jsou typické svou lehce nepříjemnou vůní, *G. densiflora* je typická příjemnou kořeněnou vůní po karafiátech (Marhold et al., 2005). V obsahu přírodních látek, které zapříčiňují specifickou vůni pětiprstky lákající opylovače, byly zjištěny rozdíly. U obou majoritních cytotypů *G. conopsea* byly nalezeny látky které se vůbec nevyskytovaly u *G. densiflora* a naopak. Opylovači zřejmě dokáží detekovat rozdíly ve složení přírodních látek, avšak v návštěvnosti tetraploidní *G. densiflora* a oktoploidní rostliny spadající pod *G. conopsea* rozdíly nedělají, což může vést k jejich hybridizaci za předpokladu překonání pre zygotických bariér (Jersáková et al., 2010).

Druhy rodu *Gymnadenia* jsou autokompatibilní a přesto závislé na opylovačích (Gustafsson 2000). Jako hlavní opylovače uvádí Jersáková et al. (2010) noční motýly z čeledi lišajovitých a můrovitých *Deilephila porcellus* – lišaj kyprejový a *Autographa gamma* - kovolessklec gama.

Květenství často obsahují mnoho současně otevřených květů (Lang, 1990), což umožňuje geitonogamní opylení. Autogamie je výjimečná (Campbell, 1999). Tobolka může obsahovat 2000 nebo více malých semen o průměrné hmotnosti 1 mg (Harper, 1977), která mohou být rozptýlena větrem do vzdálenosti 5 – 10 km (Rasmussen, 1995).

Pětiprstka, jejíž druhový název je odvozen z řeckého *konops* (= komár) pro tvarovou podobnost květů s létajícím hmyzem, je rostlinou 20 – 60 cm vysokou. Hlízy má hluboce (ne však až k bázi) dvouklané, s jednotlivými úkrojky dále dělenými ve dva nebo tři velmi protáhlé laloky. Nad nimi vyrůstají z báze lodyhy silné adventivní kořeny. Štíhlá, oblá, někdy slabě hranatá lodyha má na bázi jeden až dva zakrnělé, kožovité, pochvovité listy, a nad nimi teprve sblížené, z pochvovité báze úzce kopinaté, až 26 cm dlouhé a 4 – 40 mm široké, žlábkovité, světle zelené

listy. V horní polovině lodyhy vyrůstají jen malé, listenům podobné, přisedlé lístky. Nejhornější část lodyhy, stejně jako vřeteno květenství a okraje listenů, bývá někdy nachově naběhlá. Řídké nebo husté, 5 – 29 cm dlouhé květenství je složeno z vonných, růžových, masově červených až tmavě nachových, ojedinele i čistě bílých květů, vyrůstajících z paždí vejčité kopinatých, třížilných listenů, jež jsou zpravidla zdéli válcovitých, silně zkroucených, 8 -10 mm dlouhých, někdy nachově naběhlých semeníků. Vnější okvětní lístky jsou volné, okolo 5 mm dlouhé, vejčité podlouhlé, vnitřní kratší a užší. V obrysu více méně okrouhlý pysk je trojlaločný, poněkud delší než ostatní okvětní lístky, s laloky přibližně stejně dlouhými nebo prostředním o něco delším postranních. Obloukovitě prohnutá, celkově dolů skloněná ostruha je nitřovitá, na konci úzce zašpičatělá nebo přítupá, 1,5 – 2 x delší než semeník. Sloupek je jen asi 2,5 mm vysoký (Procházka a Velísek, 1983). Květy jsou uspořádány v poměrně hustém květenství v počtu 10 – 80 květů na rostlinu (Jersáková, nepublikovaná data).

## 2.2. Taxonomická a nomenklatorická problematika komplexu *G. conopsea*:

V posledních době se vede mnoho debat okolo taxonomického statusu v rámci komplexu *G. conopsea* (Campbell et al., 2007). Následující přehled ukazuje vývoj v názorech a poznacích z oblasti morfologie, taxonomie a poznacích o cytogenetické a genetické situaci v rámci tohoto komplexu.

V současnosti jsou nejčastěji uznávanými taxony v rámci komplexu *G. conopsea* (Marhold et al., 2005):

*G. conopsea* (L.) R. Br. s.s. - pětiprstka žežulník (zahrnuje tetraploidní a oktoploidní cytotypy a celou řadu dalších minoritních ploidí (Mrkvička, 1993; Marhold et al., 2005; Kubátová, 2008 nepublikovaná data). Tento taxon byl poprvé popsán roku 1753 C. Linnem pod jménem *Orchis conopsea* (nebo *conopea*). Rod *Orchis* byl později rozdělen a druh *Orchis conopsea* přejmenován R. Brownem na *G. conopsea* (L.) R. Br. s. s.

*G. densiflora* (Wahlenb.) A. Dietr. - pětiprstka hustokvětá (rostliny s širšími listy, květenstvím s mnoha květy příjemné vůně, tetraploidního cytotypu –  $2n = 2x = 40$ ). Taxon byl popsán Wahlenbergem ve Švédsku již v roce 1806 pod jménem *Orchis conopsea* var. [ $\beta$ ] *densiflora* a později přiřazen k rodu *Gymnadenia* a název

změněn na *G. densiflora* (Wahlenb.) Dietr., nebo také *G. conopsea* subsp. *densiflora* (Wahlenb.) K. Richt., či *G. conopsea* var. *densiflora* (Wahlenb.) Hartm. Wahlenbergovo pojmenování bylo Mobergem a Nilssonem (1991) v současnosti lektotypifikováno za použití herbářové položky z Thunbergova herbáře v Uppsale (UPS – THUNB no 21193).

*G. densiflora* se v současném chápání zdá být karyologicky uniformní (např.: Marhold et al., 2005; Kubátová, 2008 nepublikovaná data). Tomuto faktu však předcházelo mnoho prací, které se lišily v názorech na zařazení rostlin různých ploidních úrovní do taxonů.

Jak již bylo řečeno, *G. densiflora* byla popsána ve Švédku Wahlenbergem již v roce 1806, stejný taxonomický status přidělily diploidním rostlinám (z oblasti Petrohradu - blízkých areálem výskytu s *G. densiflora* popsané Wahlenbergem) ve svých studiích Averyanov (1979) a Agapovová (1993), stejně tak Agapovová u rostlin v Estonsku a Jongpierová a Jongpier (1989) na Moravě. Tato data odporují výsledkům prací autorů, kteří u rostlin popisovaných jako *G. densiflora* publikovali oktoploidní sádku chromozomů ( $2n=80$ ). První, kdo zmínil oktoploidní chromozomovou sadu u *G. densiflora* byli Löve a Löve (1961). Ti, většinou bez porovnání s herbářovými položkami a hodnocení počtu chromozomů, následně přidělili všechny dříve publikované tetraploidní rostliny ( $2n=40$ ) odpovídající *G. conopsea* s.l. k taxonu *G. conopsea* s.str. a oktoploidy ( $2n=80$ ) k taxonu *G. densiflora*. Groll (1965) také zařadil tetraploidní rostliny ( $2n=40$ ) jako *G. conopsea* subsp. *conopsea* a oktoploidní rostliny ( $2n=80$ ) jako *G. conopsea* subsp. *densiflora*. Dále uvedl, že část studovaných tetraploidních rostlin ( $2n=40$ ) měla odlišnou morfologii a to květenství s více než 150 květy, listy širší než 3 cm a velmi intenzivní vůni. Tuto rostlinu klasifikoval jako *G. conopsea* subsp. *montana*. Groll však nepoužil žádné srovnání s herbářovou položkou a z jeho poznámek o morfologii studovaného taxonu usuzujeme, že oktoploidní rostliny ( $2n=80$ ) neodpovídají rostlinám *G. densiflora*. Avšak morfologické charakteristiky, které popsal u subsp. *montana* dokonale padnou na dnešní chápání *G. densiflora* (Kubátová, 2008a). Ačkoli byl v minulosti uznán taxon odpovídající *G. densiflora* Soó (1973), není tomu tak v některých současných identifikačních klíčích nebo v Central Europea floras (Adler et al., 1994). Jako samostatný taxon byla *G. densiflora* uznána např. v pracích

Möseler (1987), Mrkvička (1993) a v současnosti i Wisskirchenem a Haeuplerem (1998).

Koncepce tohoto taxonu je heterogenní i v moderní botanice, Marhold et al. (2005) a Kubát (2002) zohlednili tuto roztržitost v názorech a přijali za vlastní rozdělení rodu (taxonu) *G. conopsea* s.l. na dva oddělené druhy: *G. conopsea* a *G. densiflora*.

*G. conopsea* subsp. *montana* Bisse je taxonomicky problematický poddruh a jeho status je stále přehodnocován. Jak již bylo zmíněno (1965), Groll použil toto jméno pro tetraploidní rostliny s odlišnou morfologií a zařadil je jako poddruh k taxonu *G. conopsea*. Původní holotyp *G. conopsea* subsp. *montana* Bisse byl s největší pravděpodobností ztracen a ostatní herbářové položky zmiňované v protologu (uloženo v GFW) jsou heterogenní (Kubátová 2008a). Současní autoři, kteří používají pro oktoploidní rostliny označení *G. conopsea* subsp. *montana* jsou např. Procházka (v publikaci Kubát, 2002) nebo Marhold et al., (2005). Avšak příbuznost mezi tetraploidní *G. conopsea* a oktoploidní rostlinou ( $2n=80$ ) zůstává nejasná (Kubátová, 2008a). Jersáková et al. (2010) hovoří o oktoploidních rostlinách jako o ploidní úrovni *G. conopsea*.

Otázkou tedy zůstává taxonomické zařazení oktoploidních rostlin, které byly dříve zaměňovány s *G. densiflora* a jejichž taxonomická odlišnost byla prokázána v práci Marholda et al. (2005). Situaci také komplikuje fakt, že se rostliny se shodnou morfologií ale odlišnou ploidií vyskytují na stejné lokalitě, což bylo zaznamenáno v ČR, Rakousku i na Slovensku (Marhold et al., 2005; Jersáková et al., 2010) a nedokážeme tak předvídat, zda se v populaci vyskytují rostliny se smíšenou ploidií či ne.

Z výše uvedeného přehledu je tedy jasné, že je *G. conopsea* taxonomicky problematický komplex. Je tedy nutné použít sofistikovanější přístup včetně testování celých populací na úroveň jejich ploidie, morfometrické hodnocení v kombinaci s metodami molekulární taxonomie a tyto výsledky porovnat s již získanými poznatky.

V rámci komplexu *G. conopsea* agg. jsou popisovány i další poddruhy či variety, jako je *G. conopsea* subsp. (nebo var.) *alpina* (Rchb. F.) Soó (= *G. conopsea* subsp. *conopsea*), která odkazuje na (sub)alpínské populace Alp a Karpat

(Marhold a Hindák, 2002; Wisskirchen a Haeupler, 1998) a dále je též v literatuře zmiňována *G. conopsea* subsp. *borealis* (Druce) M. Bateman, Pridgeon, M. W. Chase (Soliva a Widmer 1999; Delforge, 2006; Campbell et al., 2007).

Poddruh *borealis* (Druce) R. M. Bateman, Pridgeon a M. W. Chase (heath fragrant orchid; Rose, 1991; Foley a Clarke, 2005). Malé tmavo růžové květy tohoto poddruhu se vyznačují vůní hřebíčku (Campbell et al., 2007). Nalézáme ji obvykle na výše položených pastvinách severní Anglie a Skotska v nadmořských výškách nad 700 m. n. m., zvláště pak na lukách s dominantním druhem *Molinia caerulea* (Campbell et al., 2002 Campbell et al., 2007).

Druh *G. odoratissima* (L.) L. C. M. je dobře odlišitelný taxon od komplexu *G. conopsea* a je často využíván jako out group (zakořeňující skupina) ve fylogenetických studiích, pro jeho blízkou příbuznost s tímto komplexem (Kubátová, 2008a). Výskyt tohoto druhu je omezen pouze na Evropu a vyjma oblastí táhnoucí se ze severozápadní Itálie do Rumunska, kde je jeho výskyt zcela běžný, jsou jeho populace roztroušeny po celé Evropě (Gustafsson a Sjörgen – Gulve, 2002).

### **2.3. Genetická a cytogenetická variabilita komplexu *G. conopsea*:**

V poslední době se na objasnění genetické variability v rámci *G. conopsea* uplatňuje mnoho molekulárních metod a kombinace metodologických přístupů, zvláště pak studium molekulárních markerů a karyologický skríníng rostlin.

Za použití analýzy alozymů (Scacchi a Angelis, 1989) byly v rámci rodu u *Gymnadenia* odlišeny rostliny náležící ke *G. conopsea* a *G. densiflora*. Tuto metodu ve spojení s analýzou chloroplastové cpDNA a studiem morfologie květu využili ve své práci také Soliva a Widmer (1999). Avšak v obou těchto pracích chybí jakékoli záznamy o karyologickém stavu rostlin, což snižuje taxonomickou hodnotu těchto poznatků (Kubátová, 2008a). Poznatky o variabilitě chromozomů pětiprstky jsou však známy již několik desetiletí (Löve a Löve, 1961). Nicméně studie založená na analýze alozymů z roku 1989 ukazuje jasnou heterogenitu uvnitř komplexu *G. conopsea*. Soliva a Widmer (1999) našli značnou heterogenitu mezi populacemi které považovali za *G. conopsea* subsp. *conopsea* ve srovnání s jimi klasifikovanou *G. conopsea* subsp. *densiflora*. Zjistili, že tok genů mezi populacemi *G. conopsea*



je vyšší než u *G. densiflora*, a že tok genů mezi těmito dvěma poddruhy je nízký. Identifikovali také 4 cpDNA haplotypy s rozdílný počtem mikrosatelitních repetice (SSR – Simple Sequence Repeat).

Dalším hojně využívaným markerem jsou ITS (Internal Transcribed Spacer). Navzdory jasné a spolehlivé morfologické a fenologické odlišnosti *G. conopsea* a *G. odoratissima* u nich nebyla nalezena výraznější variabilita ITS sekvencí (Gustafsson a Lönn, 2003; Bateman et al., 2003). Podle práce Gustafsson a Lönn (2003) tvoří *Gymnadenia*, i při malé variabilitě v rámci ITS, dva hlavní klastry (za podpory bootstrapové analýzy): první klastr později kvetoucí rostliny *G. conopsea* ( $2n=80$ ) a *G. densiflora*, druhý klastr dříve kvetoucí *G. conopsea* ( $2n=40$ ) a *G. odoratissima*. Lönn et al (2006) shledal shodně, za použití ITS sekvencí ve srovnání s mikrosatelity, dobu kvetení jako nejvhodnější pro rozdělení druhů do těchto dvou skupin. Tato data podporují již výše zmíněné výsledky (Soliva a Widmer, 1999; Scacchi a Angelis, 1989), které poukazují na rozdíly mezi populacemi *G. conopsea* a *G. densiflora* za použití analýzy alozymů. Současná studie Jersákové et al. (2010) nenalézají u cytotypů rodu *Gymnadenia* žádnou vnitrodruhovou sekvenční variabilitu v rámci tří nekódujících cpDNA oblastí, ale na základě sekvenční variability dvou ITS oblastí odděluje *G. densiflora* od obou majoritních ploidních úrovní *G. conopsea*, přičemž ITS sekvence jsou u tetraploidní a oktoploidní *G. conopsea* shodné.

Primery pro mikrosatelity pětiprstky byly vyvinuty ve studii Gustafsson (2000) a Gustafsson a Thóren (2001) a otevřely tak novou cestu pro detailní rodičovskou analýzu a identifikaci směru toku a množství genů mezi jednotlivci a populacemi pětiprstky (Gustafsson, 2000). Avšak v této studii byly rostliny *G. conopsea*, *G. densiflora* a *G. borealis* zařazeny do jedné taxonomické jednotky. Campbell et al. (2007) ve své práci popisující variabilitu v rámci populací komplexu *Gymnadenia* použil 5 mikrosatelitních lokusů k hledání genetické odlišnosti a nalezení toku genů, který by mohl upřesnit taxonomickou hranici mezi taxony *G. borealis*, *G. conopsea* a *G. densiflora*. Z této studie vzešly tři hlavní závěry. Zaprvé byla zjištěna mírně zvýšená celková genetická variabilita, navzdory tomu, že se studované taxony pohybují v oblasti jednoho rodu. U druhů, tvořící malé izolované populace bývá obvyklá spíše nižší genetická variabilita. Za druhé, byly zjištěny vysoké hodnoty  $F_{IS}$  naznačující, že má *Gymnadenia* neobvyklou strukturu

populace, pravděpodobně s vysokou mírou inbreedingu. Za třetí, byla zjištěna genetická diference shodná s dřívější morfologickou klasifikací, rozdělující *G. conopsea* do tří oddělených taxonomických jednotek.

#### **2.4. Molekulární markery:**

Molekulární markery přinášejí informace, které pomáhají definovat odlišnosti mezi druhy a jejich zařazení v rámci blízké příbuzných skupin a upřesnit tak jejich fylogenetickou pozici. Poskytují též cenné informace vedoucí k řešení otázek hybridizace a polyploidie (Karp a Edwards, 1997). V populační genetice jsou v současnosti všeobecně využívány techniky založené na analýze proteinů - izozymů a technikách využívajících genomovou DNA jako jsou AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; dále jen AFLP), SSRs (Single Sequence Repeats; dále jen mikrosatelity), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) a sekvenování. Kodominantní markery jako jsou izozymy, mikrosatelity, sekvence a restriční fragmenty (RFLP) poskytují informace o jedinečných lokusech, n rozdíl od dominantních markerů jako jsou produkty RAPD a AFLP které jsou vícelokusové (Coates a Byrne, 2005).

## **2.4.1. Metody použité v této práci:**

### **2.4.1.1. Dominantní marker: AFLP**

Technika je založena na selektivní amplifikaci restričních fragmentů získaných štěpením genomové DNA. Genomová DNA je štěpena dvěma odlišnými restričními enzymy, jedním, který genom štěpí v mnoha místech a další štěpící ojedinele. Amplifikace restričních fragmentů je zajištěna ligací dvouvláknových adaptorů ke koncům restričních míst, které jsou následně cílovým místem pro nasedání primerů. Pro zajištění detekovatelného počtu fragmentů mají primery na svém 3' konci určitý počet a pořadí bází které přecházejí přes adaptory do restričních fragmentů (Vos et al., 1995).

Výhodami této metody jsou její použitelnost bez předchozí znalosti sekvence DNA a poskytnutí informací o polymorfismu odrážející Mendelistickou dědičnost umožňující popis, identifikaci a mapování (diskrétních) genetických znaků (Vos a Kuiper, 1997; Mueller a Wolfenbarger, 1999; Houghton – Thompson et al., 2005; Mráz et al., 2007). Potenciálně velký počet polymorfních lokusů a možnost aplikovat tuto metodu na široké spektrum organismů, dělá z AFLP jednu z neúčinnějších technik umožňujících studium genetické struktury rostlinných populací a v rámci nich dále zjišťování paternity a studium rozmnožovacích mechanismů (Krauss et al., 2002).

### **2.4.1.2. Kodominantní marker: Mikrosatelity**

Mikrosatelity jsou úseky DNA, které tvoří mono, di, tri, tetra nebo penta nukleotidové jednotky, které se tandemově opakují a jsou rozprostřeny napříč rostlinným genomem (např. Wang et al., 1994). V důsledku mutací nebo rekombinací se počet těchto repetitivních sekvencí může zvýšit nebo snížit (Šmarda et al., 2005). Přímá Amplifikace těchto malých repetitivních sekvencí přináší velké množství alel a je tak dobrým kodominantním genetickým markerem (Cregan a Quigley, 1997). Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností mikrosatelitů se používá k odlišení blízkých příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací (Šmarda et al., 2005).

Díky tomu, že mikrosatelity vykazují širokou vnitrodruhovou variabilitu, jsou techniky založené na jejich analýze využívány u mnoha rostlinných druhů ke studiu rozmnožování, v populační genetice, ke studiu paternity a mapování genomu, ke zkoumání migrace, kolonizace a disperze v prostředí, genetického driftu, efektu úzkého hrdla, změnách v efektivní velikosti populace, ke studiu toku genů mezi populacemi a ke studiu křížení (hybridizace) uvnitř populací (Jarne a Lagoda, 1996; Chase et al., 1996; Luikart a England, 1999; Ouborg et al., 1999; Friar et al., 2000; Konuma et al., 2000; Spencer et al., 2000, Sunnucks, 2000). Nevýhodou u hospodářsky méně významných rostlin může být absence známých sekvencí pro konstrukci primerů. Cílové sekvence jsou získávány klonováním částí genomu do genových knihoven a jejich následným mapováním, což je dosti náročné (Kubátová, 2008a).

#### **2.4.1.3. Průtoková cytometrie:**

Principem metody je měření vlastností izolovaných buněk a subbuněčných součástí nebo organel, které v tekutém médiu jednotlivě protékají mikroskopickou oblastí pod zdrojem s vysokou intenzitou světla (laserem) kde probíhá jejich fokusace (Robinson a Grégori, 2007).

Průtoková cytometrie (Flow Cytometry - FCM) je perspektivní analytická a preparativní technika umožňující rychlá a multiparametrická měření optických vlastností mikroskopických částic, zejména buněk a jejich komponent. Využití průtokové cytometrie u rostlin zahrnuje analýzy na různých úrovních: od molekulární a buněčné úrovně až po studium celých populací a ekosystémů. Usnadňuje také poznávání funkce buněčných organel a odhalování průběhu fyziologických procesů. Význam průtokové cytometrie narůstá i v oblasti ochrany přírody a hodnocení biodiverzity (Doležel et al., 2007). Variabilita ve struktuře a počtu chromosomů je hodnotný genetický marker uvnitř i mezi druhy (White, 1973).

#### **2.5. Morfologické znaky versus molekulární markery:**

Techniky využívající morfometrické hodnocení byly po dlouhou dobu zavedeny jako účinné nástroje zkoumající vývoj, diferenciaci a systematiku rostlin

(např.: Bookstein et al., 1985; Wiens, 2000; Forey a MacLeod, 2002; Jansen, 2003). Popularita morfometrických technik odráží jak intenzitu výzkumu prováděného na orchidejích, které jsou ve své morfologii rozmanité, tak i neobvykle vysoký podíl skupin orchidejí, které neustále představují výzvu našim schopnostem stanovit optimální hranici uvnitř a mezi druhy (např.: Bateman, 2001; Bell et al., 2009; Box et al., 2008). Ačkoli se mohou v mnoha případech morfologické znaky jevit jako nejvhodnější, mají i mnoho nevýhod jako je fakt, že některé rostlinné druhy nevykazují variabilitu v morfologických znacích a nebo se studium zaměřuje pouze na jeden znak, recesivní alely mohou být maskovány dominantními a některé z nich mohou vykazovat epistatický nebo pleiotropní efekt, a mnoho znaků (např. barva květu) musí být měřeno relativně pozdě v průběhu životního cyklu. Rostliny jsou přisedlé organismy, které nedokáží čelit predátorům a změnám prostředí, z těchto důvodů vykazují širokou fenotypovou plasticitu silně ovlivněnou prostředím. Práce, které využívají jak molekulární tak i morfologická data lépe vystihují a popisují biologickou diverzitu, než práce které se zaměřují pouze na jeden z těchto přístupů (Kubátová, 2008a), navíc porovnáním výstupů analýzy morfometrických znaků a molekulárních markerů lze říci, že vykazují překvapivě vysokou shodu ve vyjádření genetické vzdálenosti mezi zkoumanými objekty (Hillis, 1987; Fernholm et al., 1989).

### **3. Materiál a metody:**

#### **3.1. Charakteristika analyzovaných populací:**

Morfologická a cytogenetická data byla u 10 sledovaných populací pětiprstky odečtena postupně v roce 2005 a 2006, analýza molekulárních markerů byla provedena na přelomu roku 2009 a 2010.

Do analýzy morfologických znaků a molekulárních markerů bylo zahrnuto celkem 167 rostlin ze 3 studovaných taxonů. Byla u nich stanovena ploidní úroveň, odečteny morfometrické parametry, následně izolována genomová DNA a analyzovány molekulární markery.

Analyzované populace jsou svou geografickou polohou rozmístěny na území od jižní Moravy a jižních Čech až po středních a severní Čechy, a představují tak populace různých geografických a klimatických podmínek zahrnující tři sledované taxony: tetraploidní *G. conopsea*, tetraploidní *G. densiflora* a oktoploidní rostliny spadající pod *G. conopsea*.

Podrobná tabulka popisující číslo a název lokality, její zeměpisné souřadnice dále pak podrobnější popis situace na lokalitě včetně sledovaného druhu rodu *Gymnadenia* je uvedena v příloze č. 1.: Popis studovaných lokalit.

#### **3.2. Morfologické charakteristiky:**

U všech rostlin studovaných populací byly odečítány tyto morfometrické parametry: výška rostliny, délka květenství, délka stonku bez květenství, délka druhého listu, šířka druhého listu, výška posledního listu, výška prvního listenového listu, počet listů, počet listenových listů, počet květů, šířka květu, výška květu, šířka pysku, výška pysku, délka ostruhy. Hodnoty byly odečítány v období plného kvetení. Fotografie studovaných taxonů vyobrazuje příloha č. 2.: Studované taxony.

### 3.3. Průtoková cytometrie:

U všech rostlin studovaných populací byla ověřena ploidní úroveň. Analýza proběhla v Laboratoři průtokové cytometrie Botanického ústavu AVČR v Praze – Průhonicích. Na průtokovém cytometru Partec PA II.

### 3.4. Izolace DNA:

Izolace DNA byla provedena kitem Invisorb<sup>®</sup> Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

- cca 2 cm<sup>2</sup> mraženého listového pletiva bylo homogenizováno ve 400 µl Lysis Buffer s 20 µl Proteinázy K
- homogenizovaná tkáň byla inkubována 30 minut při teplotě 65°C (lyze buněk)
- suspenze byla převedena na Spin Filtr (dále jen filtr) v centrifugační zkumavce a centrifugována 12000 rpm / 1 min.
- k filtrátu bylo přidáno 200 µl Binding Buffer a vše dobře promícháno
- suspenze byla převedena na nový filtr, kde byla ponechána 1min (navázání DNA na filtr) a následně centrifugována 12000 rpm / 1 min
- filtr byl vyjmut a přemístěn do nové centrifugační zkumavky a na filtr bylo přidáno 550 µl Wash Buffer I a vše centrifugováno 12000 rpm / 1 min
- filtrát byl odstraněn a filtr umístěn zpět do centrifugační zkumavky, dále bylo na filtr přidáno 550 µl Wash Buffer II a směs centrifugována 12000 rpm / 1 min
- předchozí krok byl zopakován (za použití wash buffer II)
- filtrát byl odstraněn a filtr dán zpět do centrifugační zkumavky a centrifugován 12000 rpm / 2 min bez reagensů (vysušení filtru)
- filtr byl převeden do Receive Tube a na membránu bylo přidáno 50 µl Elution Buffer předehřátého na 65°C, vše bylo ponecháno 3 minuty inkubovat a následně centrifugováno 10000 rpm / 1min
- předchozí krok byl zopakován (za použití Elution Buffer)
- centrifugací s Elution Buffer byl získán eluát DNA I a II. který byl následně použit jako výchozí materiál (vzorek) pro další analýzy.

### 3.5. Analýza molekulárních markerů:

#### 3.5.1. AFLP:

Metoda zahrnuje níže uvedené kroky (Vos et al. 1995):

##### Restrikční štěpení:

K restrikčnímu štěpení byl použit vzorek obsahující cca 50 ng DNA, který byl připraven smícháním 5  $\mu$ l roztoku DNA a 35  $\mu$ l TE a 10  $\mu$ l níže uvedená reakční směsi (celkový objem reakční směsi činil 50  $\mu$ l). Vzorek byl inkubován 16 hodin při 37°C.

- reakční směs pro jeden vzorek:

	koncentrace	množství
H <sub>2</sub> O:	-	4,25 $\mu$ l
R/L pufr:	1 x	5 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI:	5 U	0,25 $\mu$ l
<i>Mse</i> I:	5 U	0,5 $\mu$ l

##### Ligace adaptorů:

K ligaci bylo použito 40  $\mu$ l štěpeného vzorku z předchozí reakce a 20  $\mu$ l níže uvedené reakční směsi (celkový objem reakční směsi činil 60  $\mu$ l). Vzorek byl inkubován 3 hodiny při 37°C.

- reakční směs pro jeden vzorek:

	koncentrace	množství
H <sub>2</sub> O:	-	6,2 $\mu$ l
R/L pufr:	1 x	1 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI 3':	5 pmol	0,1 $\mu$ l



EcoRI 5':	5 pmol	0,1 µl
MseI 3':	50 pmol	0,2 µl
MseI 5':	50 pmol	0,2 µl
ATP:	1,2 pmol	1,2 µl
T4 ligáza:	1 U	1 µl

- sekvence adaptorů:

*EcoRI*: 5' - CTCGTAGACTGCGTACC

*EcoRI*: AATTGGTACGCAGTC - 5'

*MseI*: 5' - GACGATGAGTCCTGAG

*MseI*: TACTCAGGACTCAT - 5'

### PCR: Pre - Amplifikace

K preamplifikaci bylo použito 5 µl vzorku připraveného ředěním ligované směsi s TO:1E 10 x (60 µl vzorku z předchozí reakce a 540 µl TO.1E) a níže uvedená reakční směs (celkový objem reakční směsi činil 50 µl).

- reakční směs pro jeden vzorek:

	koncentrace	množství
H <sub>2</sub> O:	-	36,5 µl
PCR pufr:	1 x	5 µl
MgCl <sub>2</sub> :	4 mM	2 µl
dNTP's:	200 uM	1 µl
<i>EcoRI</i> – A:	75 ng	0,15 µl
<i>MseI</i> – A:	75 ng	0,15 µl
<i>Tag</i> polymeráza:	1 U	0,2 µl

- sekvence primerů:

*EcoRI* - A: 5' AGACTGCGTACCAATTCA 3'

*MseI* - A: 5' GACGATGAGTCCTGAGTAAA 3'

- PCR cyklus:

počáteční denaturace 2min. při 94°C, dále následuje 30 amplifikačních cyklů v těchto krocích: denaturace 30 s při 94°C , nasedání primerů 30 s při 60°C, syntéza řetězců 1 min. při 72°C , na závěr reakce následuje krok dosyntetizování řetězců 9 min. při 72°C.

### **PCR: selektivní amplifikace**

K selektivní amplifikaci bylo použito 2,5 μl vzorku ředěného 20x připraveného ředěním preamplifikované DNA s TE (40 μl vzorku z předchozí reakce a 760 μl TE) a níže uvedená reakční směs (celkový objem reakční směsi činil 10 μl).

- reakční směs pro jeden vzorek

	koncentrace	množství
H <sub>2</sub> O:	-	6,018 μl
PCR pufr:	1 x	1 μl
dNTP's:	200 uM	0,2 μl
<i>EcoRI</i> - ACG:	5 ng	0,087 μl
<i>MseI</i> - AGA:	30 ng	0,095 μl
- AGT:	30 ng	0,095 μl
- ATG:	30 ng	0,095 μl
- AAA:	30 ng	0,095 μl
<i>Tag</i> polymeráza:	0,5 U	0,1 μl

- sekvence primerů:

*EcoRI*: ACG: 5' FAM - GACTGCGTACCAATTCACG 3'

*MseI*: AGA: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA 3'

AGT: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGT 3'

ATG: 5' GATGAGTCCTGAGTAAATG 3'

AAA: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAAA 3'

- PCR cyklus:

počáteční denaturace 2 min. při 94°, dále následuje 10 amplifikačních cyklů v těchto po sobě následujících krocích: denaturace 30 s při 94°C, nasedání primerů 30 s při 65°C v prvním cyklu a v následujících cyklech vždy o jeden stupeň méně až do teploty 56°C; u všech cyklů následuje syntéza řetězců 1 min. při 72°C. Dále následuje 25 amplifikačních cyklů v těchto krocích: denaturace 30 s při 94°C, nasedání primerů 30 s při 56°C, syntéza řetězců 1 min. 72°C. Na závěr reakce následuje krok dosyntetizování řetězců 15 min. při 72°C.

### **Denaturace:**

K denuraci řetězců byl použit 1 µl produktu selektivní amplifikace a 11 µl směsi formamidu a standardu 500LIZ<sup>TM</sup> (směs byla připravena smísením 11 µl formamidu a 0,4 µl standardu 500LIZ<sup>TM</sup>). Vzorek byl denaturován přesně 4 minuty při 95°C a následně umístěn do -20°C.

### **Fragmentační analýza:**

Fragmentační analýza byla provedena na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems na pracovišti Laboratoř genomiky, BC AV ČR (UMBR) v Českých Budějovicích.

### **3.5.2. Mikrosatelity:**

Mikrosatelity byly amplifikovány specifickými primery Gc 51, Gc 42, Gc 29, Gc 17 (Gustafsson 2000; Gustafsson a Thóren, 2001).

## PCR:

K amplifikaci byl použit 1  $\mu$ l vzorku (cca 10 ng DNA) a níže uvedená reakční směs (celkový objem reakční směsi činil 10  $\mu$ l)

- reakční směs pro jeden vzorek:

	koncentrace	množství
H <sub>2</sub> O:	-	3,8 $\mu$ l
TopBio MM:	-	5 $\mu$ l
f primer	Gc 17: 50 pmol	0,1 $\mu$ l - značeno FAM
	Gc 29: 25 pmol	0,1 $\mu$ l - značeno NED
	Gc 42: 5 pmol	0,1 $\mu$ l - značeno PET
	Gc 51: 8,2 pmol	0,1 $\mu$ l - značeno VIC
r primer	Gc 17: 50 pmol	0,1 $\mu$ l
	Gc 29: 50 pmol	0,1 $\mu$ l
	Gc 42: 50 pmol	0,1 $\mu$ l
	Gc 51: 50 pmol	0,1 $\mu$ l

- sekvence primerů (Gustafsson 2000; Gustafsson a Thóren, 2001):

Gc 17:	f: 5' FAM – GCCATAAATGCTCAGAAATGC 3'
	r: 5' GAGCTCATGCCCTTCTCC 3'
Gc 29:	f: 5' VIC – CATCTACACAATCATCCTAAGAAG 3'
	r: 5' CTAGACGCCATGACTTACATG 3'
Gc 42:	f: 5' NED - GAGTGAAGTGTCTTTAATCGATAAC 3'
	r: 5' GGGAGAAAGAGTGTGCATGT 3'
Gc 51:	f: 5' PET – GATCCTAGCTTTTCGTTTCAT 3'
	r: 5' AGTAATCGAGGCAACCTG 3'

- PCR cyklus (Gustafsson 2000):

Počáteční denaturace 3 min. při 94°C, následuje 35 amplifikačních cyklů v těchto po sobě následujících krocích: denaturace 30 s při 94°C, nasedání primerů – liší se v každém použitém primeru: Gc 17: 65°C; Gc 29: 63°C; Gc 42: 52°C; Gc 51: 60°C / 30 s, syntéza řetězců 45 s při 72°C, dále následuje dosyntetizování řetězců 10 min. při 72°C.

#### **Denaturace:**

K denuraci řetězců byl použit 1 µl produktu amplifikace a 11 µl směsi formamidu a standardu 500LIZ<sup>TM</sup> (směs byla připravena smísením 11 µl formamidu a 0,4 µl standardu 500LIZ<sup>TM</sup>). Vzorek byl denaturován přesně 4 minuty při 95°C a následně umístěn do -20°C.

#### **Fragmentační analýza:**

Fragmentační analýza byla provedena na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems na pracovišti Laboratoř genomiky, BC AV ČR (UMBR) v Českých Budějovicích.

### **3.6. Popis použitých metod hodnocení:**

Data získaná z fragmentační analýzy produktů AFLP (4 primerové kombinace) a mikrosatelitů (4 primerové kombinace) byla vyhodnocena v programu GeneMapper (v.4.0., Applied Biosystems). Specifické spektrum pýků – alel bylo odečteno u každého vzorku. U alel byla zaznamenána jejich velikost. Výstupem analýz byly matice lokusů AFLP a mikrosatelitů, kde symbol 0 znamená nepřítomnost alely a symbol 1 její přítomnost. Morfometrická data a data získaná analýzou molekulárních markerů byla vyhodnocena v programu MVSP (v3.1.) shlukovou analýzou a metodou UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).