

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

---

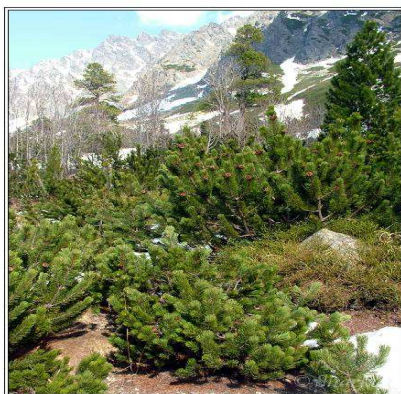
**Obor:** všeobecné zemědělství

**Specializace:** genové inženýrství a šlechtění rostlin

**Katedra:** rostlinné výroby

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Evropský agregát *Pinus mugo* – studium genetické struktury  
populací



Vedoucí diplomové práce:  
**doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D**

Autor:  
**Eva Krajníková**

---

2007

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

KRAJNÍKOVÁ E. (2007):

Evropský agregát *Pinus mugo* – studium genetické struktury populací  
[The *Pinus mugo* european complex – study of genetic structure of populations]

## ANOTACE

Historie taxonomického hodnocení agregátu *Pinus mugo* Turra je velmi komplikovaná. Tento komplex představuje skupinu evolučně mladých taxonů vzájemně se intenzivně křížících. Navíc je situace složitější příležitostným vznikem fertálních hybridů nebo celých hybridních populací s ekologicky plastickým druhem *Pinus sylvestris* L. Cílem této práce je posoudit vhodnost techniky molekulárních markerů pro účely hodnocení vnitrodruhové a mezidruhové variability v rámci agregátu *Pinus mugo*.

## ANNOTATION

The history of taxonomic classification of the complex of *Pinus mugo* Turra is very complicated. This complex being taxonomically the most complicated group of European pines is represented by the group of evolutionally relatively young taxa that hybridize intensively each other. In addition, the situation is complicated by rising of fertile hybrids or whole hybrid populations with ecologically very plastic species *Pinus sylvestris* L. The objective of this project is to explore suitability of molecular techniques for classification of intraspecific and interspecific variability in terms of the *Pinus mugo* complex.

Prohlašuji, že jsem uvedenou diplomovou práci na téma „Evropský agregát *Pinus mugo* - studium genetické struktury populací“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a s použitím literatury řádně v práci citované.

V Českých Budějovicích 28.5.2007

Eva Krajníková

## ***Poděkování***

*Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi při vypracování této práce jakkoli pomohli. Zejména děkuji svému školiteli, doc. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za odborné vedení, rady, připomínky a podporu, kterou mi během realizace této práce poskytoval. Můj dík patří dále Ing. Marušce Staré, za souhru při práci na společných úkolech a za nápady a připomínky, které umožňovaly překonávat průběžně vznikající obtíže. Děkuji také Ing. Božence Kukolíkové a ostatním studentům laboratoře za pomoc při technické realizaci pokusů a vytvoření příjemné atmosféry pro práci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala osobě mě nejbližší, jakožto i mé rodině.*

## OBSAH

1. ÚVOD .....	5
Cíl práce .....	6
2. LITERÁRNÍPŘEHLED .....	7
2.1. Základní hodnocení <i>P. mugo agg.</i> .....	7
2.1.1. Taxonomická problematika <i>Pinus mugo agg.</i> .....	7
2.1.2. Hybridizace .....	9
2.1.3. Stručná morfologická charakteristika vybraných druhů rodu <i>Pinus</i> .....	9
2.2. Taxonomický přehled čeledi <i>Pinaceae</i> .....	14
2.3. Polymorfismus na úrovni DNA .....	14
2.4. Charakteristika genetických markerů .....	15
2.4.1. Biochemické markery .....	17
2.4.2. Molekulární markery .....	17
2.4.2.1. Techniky založené na použití PCR.....	18
PCR technika .....	18
RAPD technika .....	19
SPLAT technika.....	20
AFLP technika .....	20
PCR-RFLP technika .....	23
Mikrosatelitní markery .....	25
Sekvenování.....	26
2.4.2.2. Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR .....	28
RFLP technika .....	28
Southernův přenos .....	29
VNTR technika .....	29
2.5. Elektroforetické metody .....	30
2.5.1. Volná elektroforéza.....	30
2.5.2. Elektroforéza na nosičích.....	30
2.5.2.1. Elektroforéza na papíře a Acetylcelulóze .....	31
2.5.2.2. Gelová elektroforéza.....	31
2.6. Vyhodnocování genetických markerů .....	34

3. MATERIÁL A METODIKA.....	38
3.1. Popis studovaného materiálu .....	39
3.2. Izolace DNA z rostlinného materiálu .....	40
3.2.1. Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB.....	40
3.2.2. Modifikované metody izolace DNA.....	40
3.2.3. Otestování kvality DNA na 0,8% agarózovém gelu.....	42
3.3. Analýza molekulárních markerů.....	43
3.3.1. RAPD analýza.....	43
3.3.2. PCR-RFLP .....	43
3.3.3. Sekvenování.....	46
3.3.4. Mikrosatelitní markery .....	48
3.4. Příprava reagensů .....	49
4. VÝSLEDKY .....	51
4.1. Izolace DNA .....	51
4.2. PCR-RFLP .....	52
4.3. RAPD.....	52
4.4. Sekvenování.....	53
4.5. Mikrosatelitní markery .....	55
5. DISKUZE .....	62
6. ZÁVĚR .....	65
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	66
8. PŘÍLOHY .....	71

# 1. ÚVOD

V rámci grantu GA ČR, č.521/05/2448 řešeného od roku 2005 v laboratoři Biotechnologického centra Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity je prováděna morfologická a genetická analýza populací agregátu *Pinus mugo* v rámci evropského areálu rozšíření.

Agregát *Pinus mugo* je významná skupina borovic domácích ve střední Evropě a přilehlých oblastech, a přesto skupina extrémně nejednotně klasifikovaná, s nepřehlednou variabilitou a nejasnou fylogeografií.

V rámci uvedeného projektu byly shrnuty nejnovější poznatky dlouhodobého studia populací tohoto druhu. Byl proveden rozbor různorodé klasifikace *Pinus mugo* agg. v moderní literatuře. Komplexní biogeografické studium přirozených populací *Pinus mugo* agg. a přehodnocení publikovaných dat vedlo ke kritické revizi a modifikaci původního taxonomického pojetí na základě nové teorie fylogeografie agregátu. Předběžné výsledky revize a vyplývající alternativní pojetí byly konfrontovány s relevantní nomenklaturou.

Ještě v nedávné době byla taxonomická příslušnost a mezipopulační variabilita planých druhů rostlin posuzována téměř pouze podle morfologických znaků a ekologických charakteristik. Od roku 1980 se nové perspektivy ve studiích populační genetiky rodu *Pinus* staly dosažitelné s vývojem metod molekulárního markerování. Tyto metody mají dnes velmi široké uplatnění a v komplexu s klasickou taxonomií a morfologií umožňují řešit řadu složitých taxonomických, fylogenetických a populačně genetických otázek. V současnosti již existuje řada prací zabývajících se využitím genetických markerů u planých druhů rostlin. Analýzy DNA reprezentativních populací v rámci celkového areálu agregátu *Pinus mugo* a geograficky blízkých populací příbuzné *Pinus sylvestris* L. by mohly sloužit jako podklady pro revizi a klasifikaci *Pinus mugo* agg.

## Cíl práce

Tato práce je zaměřena na zjištění genetické struktury agregátu s využitím metod molekulární biologie. Cílem této práce je posoudit vhodnost technik molekulárních markerů pro účely hodnocení vnitropopulační a mezipopulační genetické variability v rámci agregátu *Pinus mugo* Turra. Na základě analýzy molekulárních markerů bude proveden odhad podílu hybridizace na utváření významných populací a taxonů agregátu, včetně jistého hybridního ovlivnění druhem *Pinus sylvestris* L.. Cílem práce je molekulární analýza vzorků z nejméně 20 reprezentativních populací agregátu z celého jeho areálu a nejméně pěti evropských populací *Pinus sylvestris* pro analýzy jaderné DNA a organelové DNA (cpDNA a mtDNA).

Pro detekci genetické variability v přírodních populacích uvedeného agregátu je použito metodik: **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism, ZABEU a VOS 1993), **PCR-RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism, BOTSTEIN a kol. 1980), **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA, WILLIAMS a kol. 1990) a **SSR** (Simple Sequence Repeats, TAUTZ 1989). Budou tak ověřeny možnosti jejich použití pro danou problematiku.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Základní hodnocení *P. mugo* agg.

Agregát *Pinus mugo* je reprezentován podle moderní taxonomické interpretace souborem tří základních druhů, resp. mikrospecií, s těmito platnými jmény:

#### ***Pinus mugo* Turra (1764)**

syn. *Pinus mughus* Scopoli (1772)

*Pinus pumilio* Haenke (1791)

#### ***Pinus uncinata* Ramond in Lamarck et De Candolle (1805)**

syn. *Pinus uncinata* Mill. ex Mirbel (1806)

*Pinus mugo* var. *rostrata* (Antoine 1840) Hoopes 1941

#### ***Pinus rotundata* Link (1827)**

syn. *Pinus uliginosa* Neumann ex Wimmer (1837)

Tyto druhy tvořící agregát *Pinus mugo* byly v převážné části starší literatury hodnoceny jako vnitrodruhové taxony nejčastěji v kategorii variety – např. v klasických dendrologických dílech první poloviny tohoto století (SHAW 1914, REHDER 1940) v některých případech jen v kategorii formy, respektive mimo kategorie botanické nomenklatury – tj. v pojetí klimatypů (SVOBODA 1953).

#### 2.1.1. Taxonomická problematika *Pinus mugo* agg.

Celá problematika hybridních populací rodu *Pinus* na evropském kontinentu kromě jihovýchodního Středozemí se týká jen dvou taxonomických okruhů, a to druhu *Pinus sylvestris* L. a příbuzenské skupiny s nejstarším jménem *Pinus mugo* Turra, zde dále pojaté jako agregát tří samostatných druhů – *Pinus mugo* agg..

Historie taxonomického hodnocení uvedených hybridních populací i samotných výchozích taxonů je neobyčejně komplikovaná, v současné době mezi různými autory stále ještě panuje velká nejednotnost (HOLUBIČKOVÁ 1965 a 1980 vs. STASZKIEWICZ a TYSZKIEWICZ 1972 vs. CHRISTENSEN 1987c; SKALICKÝ in HEJNÝ & Slavík 1988 vs. DOSTÁL 1989). Klasifikace podrodu *Pinus* ve střední Evropě byla do začátku druhé poloviny tohoto století zatížena zejména širokým taxonomickým pojetím.

Důvody zmíněné nejednotnosti a omylů při hodnocení taxonů a interpretaci hybridizace u dotyčných evropských okruhů rodu *Pinus* lze shrnout do následujících bodů:

1. Agregát *P. mugo* je souborem geneticky blízkých druhů relativně nízkého fylogenetického stáří, u kterých proces speciace dosud nedosáhl takového stupně evoluce a znakové kvality, jako u zbývajících devíti evropských druhů borovic. Naproti tomu evropské populace *P. sylvestris* reprezentují (kromě severní Skandinávie) pouze nominální subspecii, i když velmi variabilní, a tak představující řadu variet (z nichž některé se podílejí na hybridizaci s *P. mugo* agg.).
2. Nevýrazná znaková diferenciaci mezi zástupci agregátu *P. mugo*, jednotlivé diakritické znaky nebývají u některých jedinců dostatečně vyvinuty – pro determinaci především hybridních populací je nezbytné používat soubory znaků z více jedinců.
3. V některých oblastech střední Evropy byly zachovány jen části populací. V důsledku antropických vlivů (zejména kácení, přeměny biotopů, odvodňování, výsadby cizích proveniencí, globálních změn) došlo u některých populací ke zpomalení nebo změně směru spontánních procesů a k podstatnému zhoršení čitelnosti projevů spontánní evoluce.
4. Nedostatečná komplexnost a nadhled při taxonomických studiích a revizích zabývajících se touto problematikou – většina autorů vycházela z morfologického hodnocení jedince podle uměle stanovených znakových priorit; je zde však nutné vycházet z mikroevoluce sympatrických populací, hybridizačních procesů, populační variability a ekologických vazeb; rovněž herbářové studium na úkor studiu terénnímu vede u této skupiny ke zkresleným závěrům.
5. K obecnému pochopení rozsahu mezidruhové hybridizace došlo až v nedávné době, kdy byly využity poznatky moderní populační genetiky.

Složitá problematika polymorfní skupiny taxonů okruhu *P. mugo* byla vyjasněna a podstatně zjednodušena až v posledních letech pojetím tří samostatných úzce vymezených druhů, tj. mikrospecií vytvářejících agregát *P. mugo* (SKALICKÝ 1982).

### 2.1.2. Hybridizace

Hybridizace není u rostlin příliš vzácným jevem. Například Knobloch (1972) udává v rostlinné říši téměř 24 000 mezidruhových a mezirodových kříženců.

Zjednodušeně lze říci, že k hybridizaci dochází mezi:

- 1) blízce příbuznými rostlinami
- 2) populacemi rostlin, dříve alopatrickými, jež se setkaly.

Hybridní populace většinou poznáme podle morfologických znaků – dceřinní jedinci mají znaky charakteristické pro oba rodičovské druhy – což ovšem neznámá, že jsou vždy jejich „průměrem“. Genotyp rodičovských druhů se také nemusí vždy fenotypově projevit (viz např. *Gossypium bickii*) (HARRISON 1993). Proto se pro rozpoznání takovýchto jedinců v poslední době stále více uplatňují molekulární metody.

U borovic se s hybridizací také můžeme setkat, jak uvádí například Richardson (1993), nevyskytuje se však u všech skupin. V Evropě může být takovým příkladem, jež je relativně často kříží právě *Pinus mugo* agg. Hybridizace zde probíhá jak u blízce příbuzných druhů tak i s některými méně příbuznými druhy, např. s *P. sylvestris*. Předpokládá se, že areály *P. mugo* a *P. rotundata* se setkaly vlivem změny klimatu začátkem holocénu. Proto dnes u nás na rašeliništích v nadmořských výškách 700-1000 m n. m. nalézáme především *P. ×pseudopumilio*.

### 2.1.3. Stručná morfologická charakteristika vybraných druhů rodu *Pinus*

#### *Pinus sylvestris* L. (borovice lesní)

*Pinus sylvestris* L. je strom většinou s přímým kmenem, u starších jedinců je zpravidla v horní čtvrtině větvený. Borka je šedohnědá, rozbrázděná, u dospělých jedinců v horní části kmene rezavě oranžová, odlupující se v tenkých listech. Jehlice jsou na

brachyblastech seskupeny po dvou, jsou špičaté, rovné, nebo podle podélné osy spirálně stočené. Konelety jsou nápadně stočené zpět, na poměrně dlouhých stopkách. Šišky jsou obrácené dolů, zavěšené na krátkých stopkách, aktinomorfni nebo zygomorfni. Mírně vyklenuté štítky semenných šupin mají kosočtverečný až kosínekovitý tvar. Pupek je malý, plochý nebo s krátkým zobánkovitým výběžkem. Rostlina je světlomilná, s nízkou konkurenční schopností a velkou ekologickou amplitudou. Roste ve světlých lesích, na skalách, sutích, písčinách a lemech rašelinišť.

### ***Pinus nigra* (borovice černá)**

*Pinus nigra* je evropská borovice zasahující svým výskytem do Malé Asie. Je to statný strom s kůrou na kmeni šedočernou, borka je hluboce brázditá. Jehlice jsou delší než u borovice lesní, 8 - 15 cm dlouhé, tmavozelené, tuhé, ostře špičaté, ve svazku po dvou. Kvete v červnu a červenci. Samčí květy (květenství) jsou válcovité, žlutavé, tyčinky s narůžovělým spojidlem. Samičí šišťice jsou za květu karmínově červené až nafialovělé, ojíněné, dozrávající až třetím rokem v osm až deset centimetrů velké, leskle žlutohnědé šišky se semennými šupinami naspodu černoohnědými. Vyhovují jí exponovaná skalnatá stanoviště s kamenitou půdou. Roste ve výškách pod 2000 metrů, obvyklé rozpětí je 250 - 1600 m n. m. Vyskytuje se od vápencových předhoří východních Alp až po Středomoří. V České republice je nepůvodní, avšak ve třetihorách se běžně vyskytovala. V teplých nížinách (NP Podyjí) místy vytlačuje původní borovici lesní.

### ***Pinus mugo* Turra (kleč, kosodřevina)**

Z morfologického hlediska je *Pinus mugo* polykormní dřevina, tvarem habitu keř 0,3 až 5 m vysoký se zakřivenými větvemi, ve spodní části poléhavými, na konci vystoupavými. Borka je šedohnědá, šupinovitá. Jehlice jsou na brachyblastech po dvou, k větvici mírně srpovitě zahnuté. Konelety jsou na krátkých stopkách, vzpřímené. Šišky jsou přisedlé popřípadě velmi krátce stopkaté, aktinomorfni, vejcovité. Štítky semenných šupin lesklé, ploché, široce kosínekovité s příčným silně vystoupavým lomeným kýlem, se světlejším, černě olemovaným pupkem.

Tento druh má těžiště svého rozšíření nad horní hranici lesa v Alpách, severních a středních Dinaridech, Karpatech a pohořích severního Balkánu. Kromě těchto hlavních oblastí rozšíření existují izolované výskyty v pohořích Jura, Vogesy, Šumava, Jizerské

hory, Krkonoše a nejjižnější izolovaný výskyt v pohoří Abruzzi ve střední Itálii (BUSINSKÝ 1999).

### ***Pinus rotundata* Link (borovice blatka)**

Tento druh je typický šedočernou, v horní části šedohnědou rozpraskanou ale neodlupující se borkou. Strom se začíná větvit již v dolní třetině kmene. Jehlice jsou tuhé, na brachyblastech seskupené po dvou, rovné až srpovitě zahnuté a mírně stočené podél osy. Šišky vejcovitého tvaru, zygomorfní, na krátké zakřivené stopce. Štítky semenných šupin jsou mírně vyklenuté, na osluněné straně šišky s nízce jehlanovitými mírně zakloněnými výrůstky. Pupek je světlejší, černě lemovaný.

Druh *Pinus rotundata* vykazuje nejmenší areál rozšíření a největší ekologickou specializaci v rámci agregátu *P. mugo*. Typická blatka se vyskytuje jen v prostoru podél severního úpatí a dále na sever od masívu Alp s těžištěm v jihozápadních a jižních Čechách. Nejzápadnější oblastí výskytu je pohoří Schwarzwald v jihozápadním Německu, nejsevernější jsou ojedinělé výskyty ve střední části Krušných hor a v polských Stolových horách v Kladsku (Wielkie Torfowisko Batorowskie), zatímco na východě druh zasahuje nejdál do severní části Hrubého Jeseníku (Rejvíz) a nikde nepřekračuje řeku Odru.

*Pinus rotundata* je středoevropským endemitem přechodových rašelinišť s vysokou hladinou spodní vody, vyskytující se i na vrchovištích po téměř 1000 m n.m., kde se její areál setkává s areálem *P. mugo*. To v minulosti vedlo na mnohých lokalitách k převládnutí *P. ×pseudopumilio* nad rodičovskými druhy, což některé autory vedlo k chápání blatky jako poddruhu b. kleče – *P. mugo* ssp. *uncinata* (např. Christensen 1987). Naopak polští autoři (např. STASZKIEWICZ a TYSZKIEWICZ 1972) považují blatku za křížence *P. mugo* a *P. sylvestris*. Pokud nejsou jedinci blatky geneticky ovlivněni mezidruhovou hybridizací, pak jejich typický habitus je v dospělosti vždy (alespo nízce) stromovitý s jediným přímým kmenem (tj. monokormní).

Vzhledem k areálové a ekologické vyhraněnosti, projevům hybridizace v rámci příbuzenského komplexu *Pinus mugo* agg. – *P. sylvestris* a v souladu se současným trendem taxonomie je nejpřirozenější hodnocení blatky jako samostatného druhu. Borovice blatka je, jako součást *Pinus mugo* agg., modelovým příkladem dřeviny ohrožené jednak ekologicky dlouhodobým ústupem a změnami přechodových rašelinišť, jednak geneticky vlivem mezidruhové hybridizace s tendencí vzniku introgresních rojů. Je podán návrh na

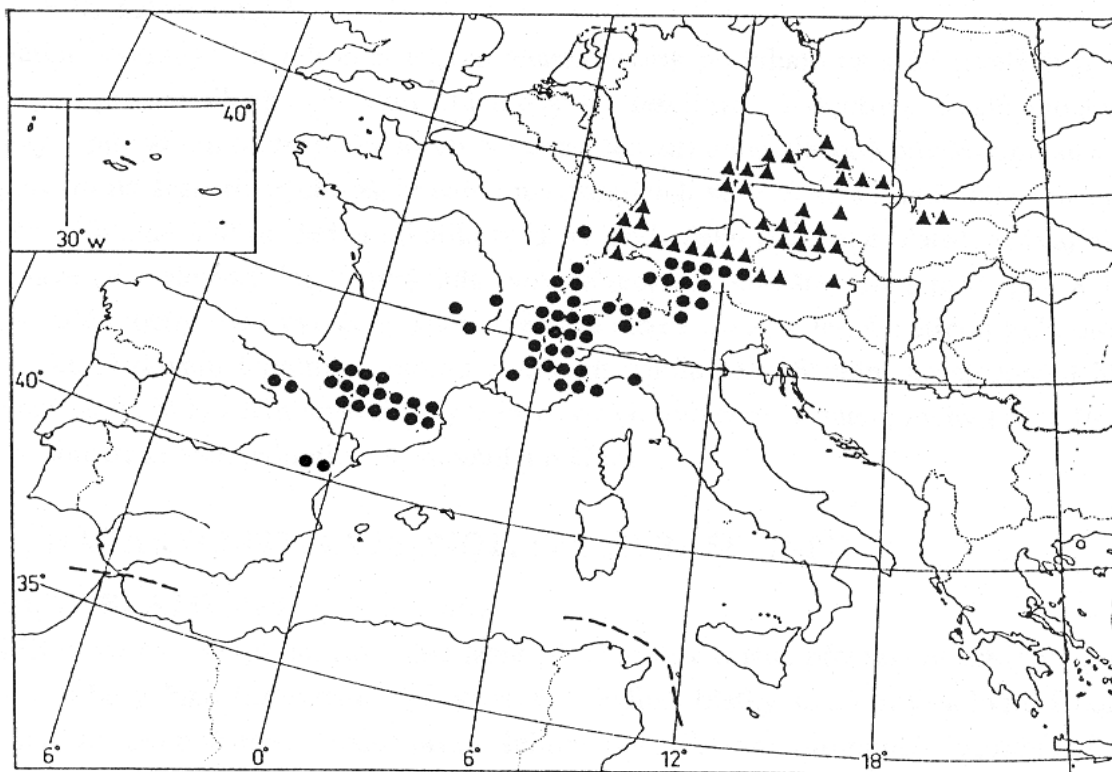
ochranu domácích populací borovice blatky s výčtem reprezentativních lokalit. (BUSINSKÝ 1998).

### ***Pinus uncinata* Ramond.**

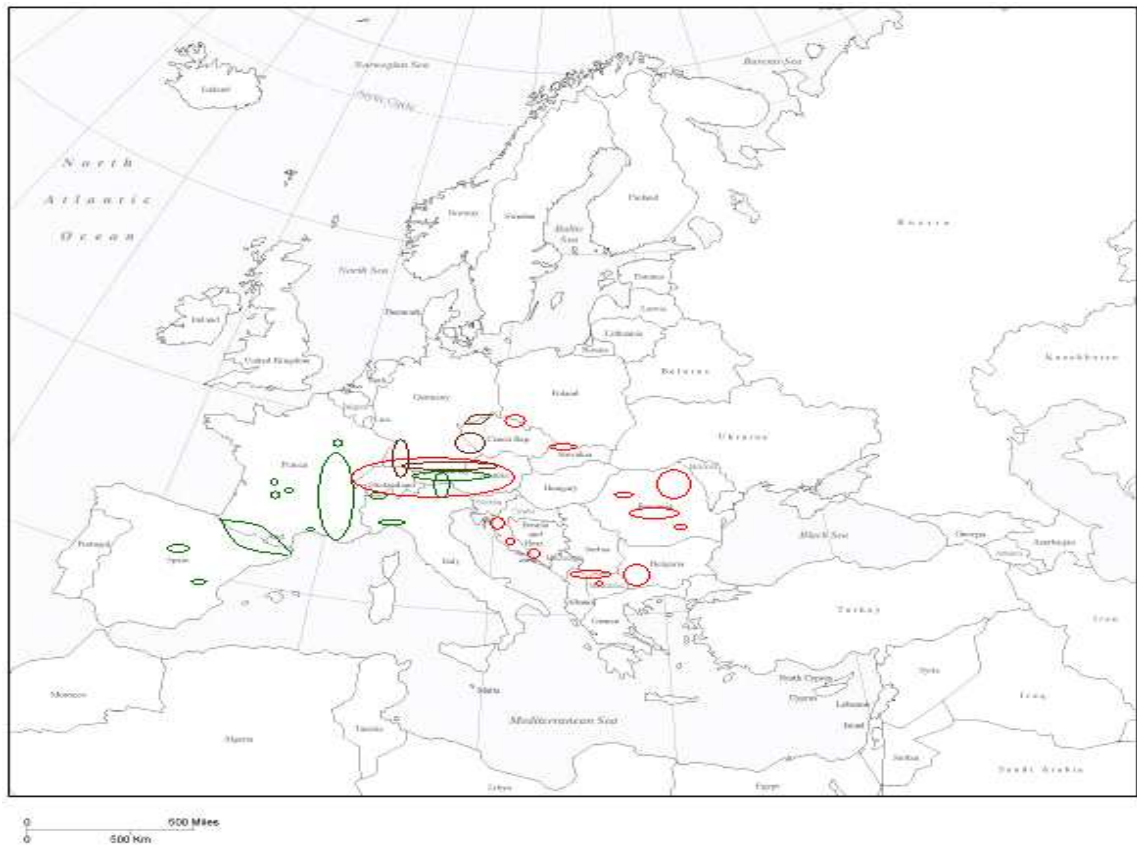
Tento západoevropský druh vzhledem připomínající blatku se vyskytuje v nerašelinných biotopech subalpinského stupně, zejména pak v oblasti Pyrenejí, Francouzského středohoří, Ligurských apenin, Alp apod., ovšem k nám již nezasahuje. Někteří autoři však na základě morfologické podobnosti považují blatku za *P. uncinata* ssp. *rotundata* (např. DOSTÁL 1989, HOLUBIČKOVÁ 1965, 1969, 1972, 1981).

### ***P. x pseudopumilio* Beck**

Tento druh je křížencem *P. rotundata* a *P. mugo*. Nápadná je variabilita v charakteru jednotlivých hybridních jedinců – od rozložitých polykormných až po štíhlé monokormní jedince s dlouhými obloukovými větvemi. U nás se s ní setkáme na rašeliništích horského stupně, zpravidla ve výškách 700- 1000 m n. m.



**Obr.1.: Mapa rozšíření výskytu druhů *Pinus rotundata* (▲), *Pinus uncinata*(●).  
Převzato a upraveno z originálu: RICHARDSON (1998).**



**Obr.2.: Mapa rozšíření *Pinus mugo* agg.**

- *Pinus mugo* Turra
- *Pinus uncinata* Ramond
- *Pinus rotundata* Link

## 2.2. Taxonomický přehled čeledi *Pinaceae*

Říše: *Vegetabilia* (rostliny)

Podříše: *Cormobionta* (vyšší rostliny)

Kmen: *Gymnospermophytae* (nahosemenné)

Oddělení: *Coniopherophyta* (jehličnany)

Třída: *Pinopsida* (jehličnany)

Podtřída: *Pinidae*

Řád: *Pinales*

Čeď: *Pinaceae* (Borovicovité)

Rod: *Pinus* (Borovice )

Druh: *Pinus mugo* (Borovice kleč )

*Pinus sylvestris* (Borovice lesní )

*Pinus uncinata* (Borovice blatka )

*Pinus uncinata* 'ssp. *rotundata*'

(GERNANDT, LISTON a PIÑERO 2001; KOBLÍŽEK 1996)

## 2.3. Polymorfismus na úrovni DNA

Pomocí DNA markerů lze detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy (populacemi, klony, jedinci, buňkami). DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Sekvence DNA se v genomu mohou vyskytovat jako jedinečné sekvence (single copy), jako středně nebo vysoce repetitivní (opakující se) sekvence s rozličnou funkcí a významem, tj. kódující, regulační a nekódující sekvence. Úroveň variability je určována řadou faktorů, např. frekvencí mutací, frekvencí rekombinací, různými formami selekce....V polymorfních regionech se můžeme setkat se dvěma typy variability – s jednoduchými substitucemi nukleotidů nebo s variabilitou v počtu tandemových opakování v repetitivních lokusech (VNTR). Zdrojem variabilních DNA oblastí je více – studium je zaměřeno na rDNA (ribozomální DNA), tDNA (tRNA), minisatelity (repetitivní sekvence 10-30bp dlouhé lokalizované poblíž telomér), mikrosatelity (1-4 bp dlouhé tandemově opakované nukleotidové sekvence) (ČURN, SÁKOVÁ 1996). Kromě tohoto typu polymorfní DNA jsou v genomu obsaženy náhodné



genomické sekvence většinou používané v RFLP a RAPD analýzách (BACHMANN 1992).

Molekulární markery jsou využívány např. pro DNA fingerprinting při zjišťování genetické čistoty osiva, ale i pro testování otcovství, sledování určitých genů během šlechtitelských programů (např. SLG geny), genetické mapování, populační genetiku a populační genekologii a při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické analýzy, řešení taxonomických otázek).

Je prokázáno, že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (CHLOUPEK 1995).

### **Metody detekce DNA polymorfismu**

Zavedení a rychlý rozvoj této techniky na přelomu 80. a 90. let minulého století výrazně zjednodušil řadu protokolů používaných v molekulární biologii. Technika PCR vnesla do rozvoje DNA fingerprintingu a jeho využití ve výše zmiňovaných aplikacích neočekávanou dynamiku. PCR může být použita i k náhodnému testování variability sekvencí v rámci celého genomu. Při použití krátkých náhodných primerů (cca 10bp) lze získat v relativně krátkém čase spektrum amplifikačních produktů, které se liší svojí délkou. Toto spektrum je obvykle polymorfní v rámci dané populace (RAPDs – random amplified polymorphic DNAs) a různá spektra získaná na základě amplifikační reakce za použití různých primerů vytváří detailní „fingerprint“ DNA. PCR fingerprinting, využívající krátkých náhodných primerů se stává analogií klasického DNA fingerprintingu (BACHMANN 1992; WILLIAMS a kol., 1993; SÁKOVÁ a ČURN 1998).

## **2.4. Charakteristika genetických markerů**

Jelikož je studium genetické struktury populací pomocí klasických morfologických charakteristik problematické a obtížné (vzhledem ke značnému vlivu prostředí na fenotypové projevy řady znaků), jeví se jako nejvhodnější řešení využití genetických metod (ČURN a SÁKOVÁ 1997; HAMRICK 1990).

Jednou z těchto metod genetické analýzy populací je hodnocení biochemických a molekulárních markerů. (ČURN a SÁKOVÁ 1997).

Termín **genetický marker (signální gen)** se používá pro označení jasně se fenotypově projevujícího znaku s jednoduchou dědičností. Označení marker pak předpokládá spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními či kvalitativními znaky. Je třeba, aby se genetické biochemické markery vyznačovaly dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrancí a rovněž vysokou heritabilitou, tj. nezávislostí na podmínkách prostředí (ČURN a SÁKOVÁ 1996).

Použití genetických markerů je velmi široké, s úspěchem je jich využíváno při řešení taxonomických, fylogenetických a populačně genetických studií, dále k hodnocení biodiverzity planých druhů rostlin, ve studiu interakcí patogen-hostitel (mikroorganismus-rostlina), ke genetické analýze somatických a vzdálených hybridů, pro detekci mutací, pro markerování morfologických a fyziologických znaků, konstrukci genových map. Dále jich je využíváno ve šlechtění a semenářství, k hodnocení šlechtitelského materiálu, markerové selekci a k hodnocení čistoty a pravosti odrůd a osiva aj.

Základní rozdělení metod genetických markerů:

- **iso(en)zymy**
- **DNA markery**
  - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
  - založené na PCR (polymerase chain reaction)
    - celý genom – délkový polymorfismus fragmentů
      - o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
      - o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
    - části genomu
      - o PCR-RFLP
      - o mikrosatelity (SSRs)
  - sekvenování

### 2.4.1. Biochemické markery

Kritéria pro biochemické markery velmi dobře splňují proteiny, neboť se vyznačují vysokým stupněm geneticky fixovaného polymorfismu, kodominantní dědičností, rozlišitelností alel v individuích a jistou mírou nezávislosti na prostředí. Takovými systémy mohou být například zásobní bílkoviny nebo isoenzymy (isozymy, mnohočetné molekulární formy enzymů, které se postupně nahrazují během vývoje organismu, nebo formy které katalyzují stejnou reakci v různých částech organismu nebo buňky). Jelikož vykazují genetický polymorfismus, mohou být využity jako diferenční markery u odrůd s větším efektem než klasické morfologické markery.

#### **Isozymy, allozymy**

Isozymy, allozymy představují skupinu enzymů katalyzujících významné biochemické reakce. Do této skupiny lze zařadit například transferázy, oxidoreduktázy, isomerázy, hydrolázy, lyázy, ligázy.

V metabolismu plní stejné funkce, mají však různé lokusy, různé alely (allozymy). Pracují na principu různé migrační rychlosti enzymů nebo jejich částí v elektrickém poli, jež je dána jejich velikostí, tvarem, elektrickým nábojem. Výsledkem analýzy je zymogram, pro hodnocení je však nezbytná znalost kvartérní struktury enzymů. Určení mezipopulační variability je dáno genetickou vzdáleností nebo podobností, z matice koeficientů je možno sestavit dendrogram.

**isozymy** – katalyzují stejnou reakci

**allozymy** – produkty (alely) jednoho genu

### 2.4.2. Molekulární markery

Molekulární markery jsou markery na bázi nukleových kyselin, zejména DNA (RFLP, PCR, RAPD, PCR-RFLP, AFLP, SPLAT, SSR, rDNA, mtDNA, cpDNA, sekvenování)

DNA markery jsou markery na úrovni DNA. Umožňují jednoduše detekovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markerovací systémy jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců (populací) (ČURN 1998).

Je prokázáno že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (CHLOUPEK 2000).

#### **2.4.2.1. Techniky molekulárních markerů založené na použití PCR**

- **PCR technika** (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce) (SAIKI a kol. 1985, SAIKI a kol. 1988)
- **RAPD technika** (Randomly Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA) (GROSBURG a kol. 1996)
- **SPLAT technika** (Specific Polymorphic locus Amplification Test – amplifikace specifických polymorfních lokusů) (GRAMAN a kol., 1999).
- **AFLP technika** (Amplification Fragment Length Polymorphism – polymorfismus amplifikovaných fragmentů) (ŠMARDA a kol. 2005; SÁKOVÁ a ČURN, 1996).
- **PCR-RFLP technika** (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restrikčních fragmentů produktů PCR) (ONDŘEJ 1999).
- **Mikrosatelitní markery** (SSR – Simple Sequence Repeats, STR – Short Tandem Repeats) (ŘEPKOVÁ a RELICHOVÁ 2001)
- **Sekvenování** (PANTŮČEK 2005).

#### **PCR technika - polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou ze základních a dobře zavedených metod molekulární biologie. Byla vyvinuta v Cetus Corporation Emeryville v Kalifornii. (SAIKI ET AL. 1985, SAIKI ET AL. 1988). Celý proces byl automatizován a patentován v roce 1985 Kary B. Mullisem (MULLIS 1987).

Tato metoda umožňuje mnohonásobnou vysoce specifickou amplifikaci vybraného úseku DNA. PCR se používá jak pro přímou detekci, tak i jako přípravný krok pro získání

dostatečného množství DNA pro další experimenty, tudíž ji lze s úspěchem použít i v případech, kdy je k dispozici jen malé množství vzorku.

PCR je metoda založená na mechanismu replikace. K syntéze templátové molekuly DNA se využívají specifické termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. **Taq DNA- polymeráza** pocházející z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, odolávající zvýšené teplotě při níž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně, formou cyklů, kdy se pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu. Celá reakce probíhá v *in vitro* podmínkách v prostředí pufru obsahujícího ionty hořčíku.

- 1) denaturace dvouřetězcových molekul templátové DNA (94°C)
- 2) připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C)
- 3) syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75°C)

Reakce probíhá v **termocycleru**, kde se automaticky mění teplota v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly (DOŠKAŘ a PANTŮČEK 2005).

PCR produkty (amplikony) jsou separovány na agarózovém gelu a vizualizovány pomocí ethidiumbromidu.

### **RAPD technika – polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA )**

V posledních několika letech se při studiu variability DNA na populační úrovni prakticky všech skupin organismů využívá metody “náhodně amplifikované polymorfní DNA“ (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA, WILLIAMS a kol., 1990).

Metoda RAPD je jednou z mnoha modifikací polymerázové řetězové reakce. Od PCR se ale RAPD odlišuje zejména v těchto aspektech:

- 1.) využívá toho, že do amplifikace vstupuje pouze jeden arbitrární primer a délce deset nukleotydů (náhodně vybraných s ohledem na zastoupení jednotlivých bazí – vyrovnaný poměr C:G)
- 2.) nukleotidová sekvence primeru je libovolná

3.) teplota při “annealingu“ , neboli nasedání primeru na komplementární DNA sekvence je relativně nízká (35-38 °C) což zvyšuje pravděpodobnost nasednutí primeru na mnoha místech molekuly DNA (primery jsou tzv. nespecifické).

Pro výběr primeru nepotřebujeme žádnou znalost konkrétních sekvencí, můžeme použít jakýkoliv primer a zajímá nás jen to, který z nich vykazuje u studovaných vzorků polymorfní pattern. V současnosti je na trhu k dostání více než 400 různých primerů (Firma Operon Technologies).

Princip této metody spočívá v tom, že primery nasednou na protiběžných řetězcích DNA v amplifikovatelné vzdálenosti od sebe (do cca 4 kb). V tuto chvíli je umožněna amplifikace části DNA mezi nimi. Výsledkem reakce RAPD je amplifikace velkého počtu genomových sekvencí (amplikonů) procesem shodným s PCR. Počet a délky jednotlivých amplikonů jsou charakteristické pro každou kombinaci genomu a primeru.

Rozdíly v sekvencích genomové DNA se po reakci RAPD projeví jako polymorfismus délek amplifikačních fragmentů (AFLP, Amplification Fragment Length Polymorphism) (Caetano-Anollés 1991). Produkty této reakce můžeme elektroforeticky separovat podle délky na 1,8% agarózovém gelu v TBE bufferu a vizualizovat pomocí ethidiumbromidu. Výhody této metody spočívají v tom, že je relativně levná, časově a na laboratorní vybavení nenáročná a zvládne ji i začátečník.

### **SPLAT technika – amplifikace specifických polymorfních lokusů (Specific Polymorphic locus Amplification Test) (GRAMAN a kol., 1999)**

Amplifikace specifických polymorfních lokusů představuje typ PCR reakce, kdy je amplifikován specifický úsek DNA vymezený dvěma primery definovaného lokusu (GRAMAN a kol. 1999).

### **AFLP technika – polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplification Fragment Length Polymorphism) (ŠMARDA a kol.2005; SÁKOVÁ a ČURN, 1996)**

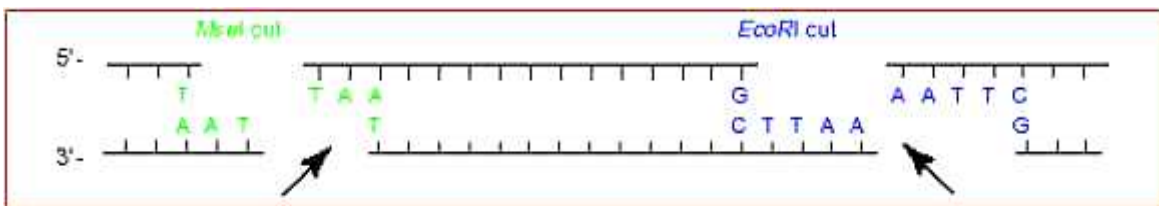
Tato metoda kombinuje restriční štěpení DNA (technika RFLP) a amplifikaci DNA (technika PCR) . Její princip spočívá v selektivní amplifikaci restričních fragmentů celého genomu. Postup se skládá ze tří základních kroků:

**1. restrikce** - rozštěpení genomické DNA dvěma restrikčními endonukleázami na fragmenty, na něž se nalignují adaptory (adaptor je krátký úsek DNA se známou sekvencí, který má komplementární konec s koncem fragmentu po štěpení).

*MseI* – rozpoznává 4bp dlouhou sekvenci (čtyřbázový palindrom TTAA)

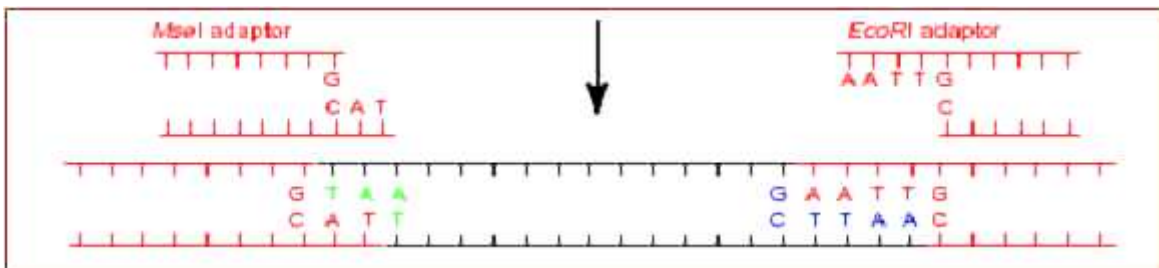
*EcoRI* – rozpoznává 6bp dlouhou sekvenci (šestibázový palindrom GAATTC)

Výsledkem je velké množství fragmentů, které mají na jednom konci *MseI* a na druhém konci *EcoRI* štěpné místo.



**2. ligace** – Pomocí T4 ligázy jsou ke všem fragmentům připojeny adaptory, nyní tedy známe sekvence začátků a konců všech fragmentů.

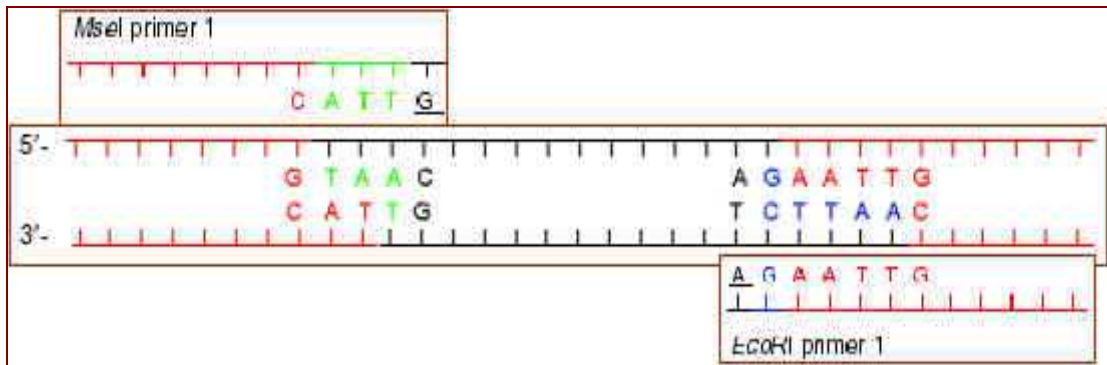
Štěpení a ligace se provádí v jedné reakci.



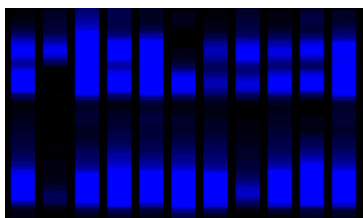
**3. Selektivní amplifikace** – většinou se provádí ve dvou krocích:

- **preselektivní amplifikace** – jelikož již známe počáteční sekvence počátků všech fragmentů, můžeme je přidáním specifických primerů namnožit pomocí PCR. Velké množství fragmentů je třeba redukovat na počet, který budeme schopni vyhodnotit. Primery jsou komplementární a adaptorům, avšak o 1 bázi delší takže přesahují "dovnitř" studovaného fragmentu. Namnoží se tedy pouze 1/4 všech fragmentů (pouze ty jež mají na příslušném místě komplementární bázi), tj. protože používáme 2 primery, je amplifikována pouze 1/16 fragmentů (1/4 x 1/4).

- **selektivní amplifikace** - fragmentů je stále ještě příliš mnoho na to, abychom je mohli spolehlivě vyhodnotit, je tedy třeba jejich počet dále zredukovat. Využijeme primery se třemi selektivními nukleotidy (přesahy "dovnitř" studovaných fragmentů). V tomto případě je amplifikována pouze 1/256 všech fragmentů (1/16 x 1/16) (PERKIN ELMER 1995).



Vyhodnocení lze provést na agaróze, polyakrylamidu, nebo pokud v předcházejícím kroku použijeme *EcoRI* primer označený fluorescenční barvou, můžeme k vyhodnocení fragmentů využít automatický sekvenátor. Výkonost můžeme mnohonásobně zvýšit, pokud použijeme multi-color fluorescenční systém (PERKIN ELMER 1996).



**Obr.3.: Příklad vizualizace po použití *EcoRI* primeru označeného fluorescenční barvou**

Tato metoda má řadu výhod, mezi nejdůležitější patří generování velkého množství markerů. Je cílena zejména pro účely mapování významných kvalitativních a kvantitativních znaků. Tato metoda nachází uplatnění také při studiu biodiverzity a přípravě markerů. AFLP generuje dominantní markery a představuje velký počet signálů v jedné reakci.

Dále není potřeba žádná předchozí znalost o studovaném organismu (nemusíme znát žádné jeho cílové sekvence), je neradioaktivní, odráží variabilitu skrz celý genom,



výsledky jsou dobře reprodukovatelné a spolehlivé. Nevýhodou této metody však je její relativní komplikovanost a finanční nákladnost.

Je to velmi vhodná metoda pro *definici klonů*, jednoznačně určí genotyp a oproti např. izozymům vykazují AFLP markery mnohem větší variabilitu. Dále je možné této metody využít v *populačně-genetických studiích*, kdy chceme zjistit vnitro- a mezipopulační variabilitu a diverzitu, určit podobnost mezi populacemi (kvantifikace genového toku, studium šíření rostlin) či k fylogeografickým studiím. Díky vysoké variabilitě a spolehlivosti této metody je možné využití AFLP pro *analýzu rodičovství (parentage analysis)* a v mnoha dalších oblastech.

Firma PERKIN ELMER, která vlastní patent pro tuto metodu (European Patent 924026297), nabízí připravené kity pro mnoho druhů kulturních rostlin. V současnosti brání širšímu rozšíření AFLP pouze vysoké pořizovací náklady na kapilární elektroforézu.

### **PCR-RFLP technika (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restrikčních fragmentů) (ONDŘEJ 1999).**

Tato metoda v sobě zahrnuje spojení dvou metod: PCR a RFLP. Úvodním krokem je amplifikace PCR markeru (např. ITS oblasti). Po následném rozštěpení restrikční endonukleázou jsou fragmenty elektroforeticky separovány na gelu. Díky bodovým mutacím lze odlišit dominantní a recesivní alely studovaných genů/mezigenových regionů.

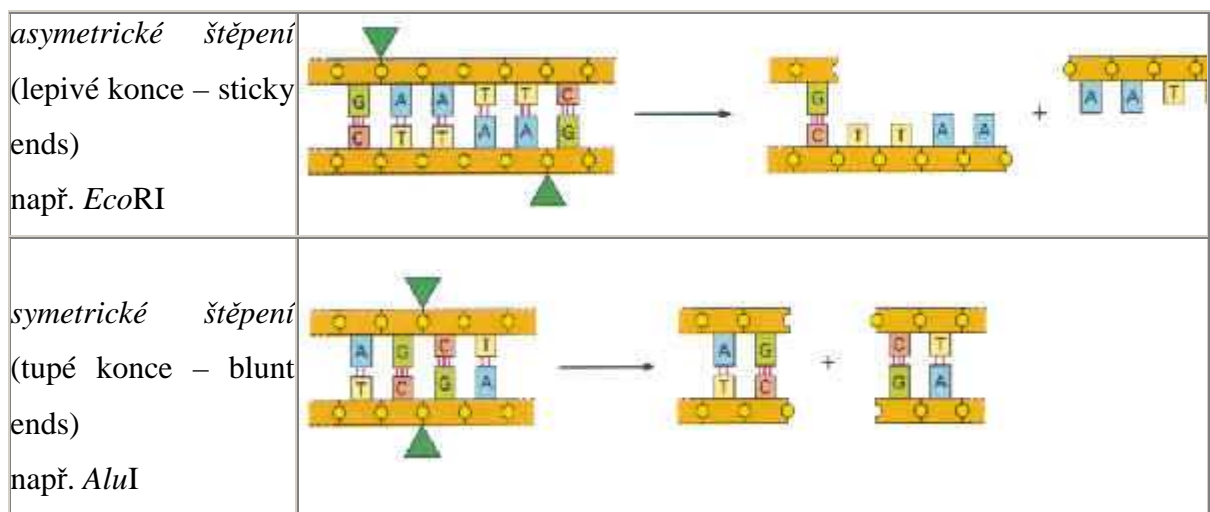
RFLP analýza je závislá na dostupnosti DNA sond pro detekci homologních sekvencí. RFLP markery na jaderné DNA jsou používány jako kodominantní markery v genetické analýze a pro sestavování RFLP map (BACHMANN 1992). Ve srovnání s metodami postavenými na amplifikační strategii však vyžaduje velké množství čisté DNA. Celý postup od izolace přes restrikci až k hybridizaci je poměrně časově náročný. Tato metoda je současně používána k identifikaci různých genotypů, včetně lidského, a je hojně používána v soudním lékařství nebo k určování paternity (SAMBOOK a kol. 2001).

Tato metoda se skládá ze tří kroků:

- 1. amplifikace** (zvýšení počtu kopií DNA-sekvence) konkrétního úseku DNA (například intergenických oblastí v chloroplastové DNA) pomocí dvojice známých primerů. Často se používají primery, které jsou komplementární k začátkům a koncům kódujících genů

okolo nekódující intergenické oblasti. Tyto primery jsou pak využitelné u většiny rostlinných druhů. Výsledkem je namnožený produkt o délce 1000-4000 bp

2. **restrikce** (naštípání) namnoženého úseku pomocí enzymů zvaných restrikční endonukleázy, které specificky štěpí DNA. Například enzym zvaný *EcoRI* rozštěpí DNA vždy, pokud nalezne sekvenci 3'-GAATTC-5'. Pokud je takovéto místo v našem studovaném úseku DNA právě jednou, uvidíme pak po elektroforéze místo jednoho proužku dva. Pokud ale bylo místo změněno, např. mutací, k rozštěpení nedojde a proužek bude stále jeden. Pomocí této metody tedy hledáme polymorfismus v restrikčních místech nejruznějších endonukleáz a následně ho interpretujeme jako příbuznost či nepříbuznost organismů. Restrikce musí probíhat za stálého optimálního pH a teploty. Stálé pH je zaručeno přidáním restrikčního pufru do reakční směsi, stálou teplotu zajistí inkubátor nebo příslušně nastavený termocykler.
3. **elektroforéza** naštípaných fragmentů + **visualizace** fragmentů (např. pomocí ethidium bromidu) a **vyhodnocení variability**



Předností této metody je, že je relativně jednoduchá, postačí malé množství DNA. Mezi další výhody můžeme zařadit také vysoce reprodukovatelné pattern, variabilitu v konkrétní části genomu (nekódující úseky cpDNA), dále není potřeba předchozí molekulární znalost o studovaném organismu (využití konsenzuálních primerů, které fungují pro řadu nejruznějších druhů z mnoha čeledí).

Nevýhodou je však omezená variabilita při použití cpDNA, nutný počáteční screening pro nalezení kombinací jednotlivých amplifikovatelných úseků a restriktivních endonukleáz, které vykazují nějakou variabilitu.

PCR-RFLP může být využito v systematice k rekonstrukci fylogeneze, při studium hybridizace k identifikaci mateřského taxonu (jedince), dále pak ve filogeografii k rekonstrukci postglaciální rekolonizace, v lékařství k prenatalní diagnostice hemofilie A u rodiny, která nese určitý typ mutace aj.

### **Mikrosatelitní markery (SSR – Simple Sequence Repeats, STR – Short Tandem Repeats)**

Mikrosatelitní markery (SSR – Simple Sequence Repeats, STR – Short Tandem Repeats), které byly v této práci použity k detekci variability genotypů *Pinus mugo* agg. jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů 1 – 6 nukleotidů např. (GA)<sub>n</sub> (ŘEPKOVÁ a RELICHOVÁ 2001). Mikrosatelity se řadí k metodám lokusovým, kdy se sleduje jen určité, předem definované místo v genomu a k metodám amplifikačním, kdy je fragment DNA namnožen pomocí polymerázové řetězové reakce – PCR. SSR markery jsou součástí nekódujících oblastí genomu a celková délka nepřesahuje 100 bp. Podle složení se SSR markery člení na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalé mikrosatelity jsou tvořeny souvislým motivem, např. (AG)<sub>24</sub>. Nedokonalé mikrosatelity se vyznačují tím, že základní mikrosatelitový motiv je přerušen sledem náhodných bází. Několika různými motivy jsou pak tvořeny mikrosatelity složené, např. (AG)<sub>14</sub>(AT)<sub>35</sub>.

Mikrosatelitní markery mají vysokou informační hodnotu (OVESNÁ a kol. 2002). To znamená, že umožňují rozlišení homozygotů (1 fragment) a heterozygotů (2 fragmenty). Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací. Dále jsou ideální ke genetickému mapování pro svoji hojnost v genomu, vysoký stupeň polymorfizmu, široké rozptýlení v genomu, nezávislost na vnějších podmínkách, vysokou reprodukovatelnost, snadné rozšíření mezi laboratořemi a jednoduchost provedení PCR reakce (LIU a kol. 1996).

#### *chloroplastové mikrosatelity (cpDNA SSRs)*

- vhodné pro hodnocení variability na úrovni příbuzných druhů, někdy i na vnitrodruhové úrovni
- k dispozici 10 párů univerzálních primerů značených fluorescenční barvičkou pro použití na sekvenátoru

#### *jaderné mikrosatelity (SSRs)*

- nejlepší marker pro zhodnocení variability na populační úrovni
- druhově specifické primery - použitelné pouze v případě, že pro studovaný druh byly primery již publikovány
- po otestování amplifikovatelnosti lze využít fluorescenčně značené primery a pro hodnocení variability automatický sekvenátor.

### **Sekvenování**

Cílem sekvenování je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů (resp. bází) v jednom z řetězců DNA (druhý řetězec je komplementární). Metody, jež umožňují rychle a spolehlivě stanovit sekvenci nukleotidů hrají klíčovou roli v analýze genomů a umožňují lépe porozumět molekulární podstatě základních biologických procesů. Znalost sekvence DNA se používá k odvození informace o aminokyselinové sekvenci kódovaných proteinů, regulaci jejich tvorby a umožňuje též detailně stanovit charakter mutací. Znalost sekvencí DNA značně urychlila rozvoj dalších molekulárních metod, mezi které patří například PCR jejíž provedení je na znalosti DNA závislé.

Pro sekvenování byly vyvinuty dvě principiálně odlišné metody:

- chemická Maxamovo-Gilbertova metoda
- enzymatická Sangerova metoda

#### ***Chemická metoda sekvenování (Maxamovo-Gilbertova)***

Podstatou této metody je specifické štěpení molekuly DNA působením chemických činidel v místech, kde se nachází báze určitého typu. Výchozím materiálem je soubor identických fragmentů jednovláknové DNA jež jsou na jednom konci označeny radioaktivní značkou. Každou ze čtyř bází v molekule DNA je možné modifikovat tak, aby na jejím místě bylo možno dosáhnout přerušení řetězce DNA. Takovéto modifikace bází

lze navodit například použitím hydroxidu sodného (štěpení A,C), dimetylsulfátu (štěpení G), kyseliny mravenčí nebo hydrazinu (štěpení C,T). Je však třeba nastavit podmínky reakce tak, aby byla takto modifikována pouze jedna báze v řetězci. Pomocí této modifikace se vytvoří na řetězci DNA křehké místo citlivé ke štěpení a působením piperidinu a vysoké teploty dochází v tomto místě k rozštěpení řetězce.

Výsledkem této reakce je soubor fragmentů DNA různých délek, jež odpovídají vzdálenosti určité báze od značeného konce výchozí molekuly DNA.

Sekvenování probíhá v následujících sedmi krocích:

1. příprava označených jednořetězcových fragmentů DNA, u kterých chceme sekvenci stanovit
2. rozdělení souboru fragmentů do čtyř vzorků
3. modifikace báze DNA každého vzorku pomocí chemické látky
4. rozštěpení DNA ve všech místech, kde byly báze modifikovány
5. rozdělení fragmentů DNA elektroforézou v polyakrylamidovém gelu, nanesení vzorků každé ze čtyř reakcí v definovaném pořadí na gel
6. autoradiografická detekce těch fragmentů, které mají označený konec
7. stanovení sekvence DNA z autoradiogramu

Tato metoda sekvenování má však mnoho nevýhod, proto se příliš nepoužívá. Data, která jsou výsledkem této metody jsou méně přesná než data metody enzymatické, což je zapříčiněno různými nečistotami chemických činidel. Dále je nezbytné využití radioaktivně značených konců s vysokou úrovní radioaktivity. Tento způsob sekvenování poskytuje kratší sekvence a postup při jejich získávání je laboratorně náročnější.

### ***Enzymatická metoda sekvenování (Sangerova)***

Tato metoda je v současné době nejběžnější metodou sekvenování. Při této metodě je molekula DNA jejíž sekvenci chceme stanovit použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky prostřednictvím DNA-polymerázy.

Stejně jako u chemické metody sekvenování jsou reakce prováděny ve čtyřech oddělených vzorcích. Každá reakce je určena ke stanovení relativní pozice specifické báze na konci analyzovaného řetězce. To je provedeno přípravou reakčních směsí, které obsahují:

- purifikovanou molekulu DNA u které chceme stanovit sekvenci
- primer připojující se k části molekuly DNA
- směs obsahující 4 normální nukleotidy a jeden ze čtyř ddNTP
- DNA-polymerázu

Abychom mohli nově syntetizované sekvence detekovat je třeba, aby byl primer, ddNTP nebo jeden ze čtyř dNTP radioaktivně či neradioaktivně označen. Po proběhnutí polymerizační reakce se produkty denaturují a separují na polyakrylamidovém denaturujícím gelu stejně tak, jako při chemické metodě. Podobně probíhá i vyhodnocení dat z autoradiogramu. (PANTŮČEK 2005)

#### **2.4.2.2. Techniky molekulárních markerů založené na hybridizaci bez použití PCR**

- **RFLP (CAPS) - polymorfismus délky restrikčních fragmentů** (Restriction Fragment Length Polymorphism, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
- **VNTR technika** (Variability of Number Tandem Repeats – variabilita počtu tandemových repeticí) (RACLAVSKÝ 1998).
- **Southernův přenos** (Southern blotting) (ŽUROVEC a kol.1999).

#### **RFLP (CAPS) - polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)**

Analýza délkového polymorfizmu restrikčních fragmentů (RFLP) je metoda založená na funkci restrikčních endonukleáz. Tyto enzymy katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby specificky v místě konkrétní palindromické deoxynukleotidové sekvence.

Frekvence štěpení se liší podle délky specifické cílové sekvence restriktázy. Například při použití restriktázy se čtyřnukleotidovým rozpoznávacím místem dostaneme frekvenci pravděpodobného štěpení jednou na 256 nukleotidů ( $4^4$ ). Existuje velké množství restrikčních endonukleáz a různými a různě dlouhými rozpoznávacími sekvencemi.

Restrikčním štěpením je získána sada fragmentů o různé velikosti. Fragments jsou následně separovány gelovou elektroforézou a vytvářejí charakteristický pattern. Takto získané patterns jsou porovnávány s již publikovanými patterns (ALBERTS a kol. 1998).

RFLP je metoda vhodná pro studium variability blízce příbuzných skupin, proto se hodí i pro studium druhové variability komplexu *Pinus mugo*. Ke zmnožení úseku se opět používá PCR, po kterém pak RFLP následuje.

### **VNTR technika – variabilita počtu tandemových repetíci (Variability of Number Tandem Repeats) (RACLAVSKÝ 1998).**

Rozsáhlého využití doznala technika DNA fingerprintingu, využívající krátké nespécifické sondy a detekující polymorfismus na úrovni středně repetitivních sekvencí – tzv. minisatelitů (jsou tvořeny opakováními úseků sekvencí dlouhých od 10 – 60 párů bází). Tyto minisatelity se s největší pravděpodobností vyskytují v různých pozicích v celém eukaryontním genomu. Počet opakování určitého minisatelitu může u jednotlivých jedinců studované populace kolísat (VNTR) a tato variabilita je detekována jako variabilita délky restrikčních fragmentů po štěpení DNA restrikčními enzymy, které neštěpí v rámci sekvencí dané repetice. Pravděpodobně nejvýznamnější aplikace analýzy minisatelitů v rostlinné evoluci je hodnocení čistoty a identifikace klonů a studium evolučních otázek (BACHMANN 1992).

Dalším typem velmi krátkých repetitivních sekvencí rozptýlených po eukaryontním genomu jsou mikrosatelity (LITT a LUTY 1989). Mikrosatelity jsou tvořeny tandemovými opakováními úseků dlouhých 2 – 6 bází a vykazují rozsáhlý polymorfismus daný délkou opakování těchto krátkých motivů a představují stabilní kodominantní systém využitelný pro identifikaci genotypů a mapování rostlinného genomu (MORGANTE a OLIVIERI 1993). Na rozdíl od minisatelitů jsou amplifikovány pomocí PCR a jsou zjištělné elektroforézou (ŘEHOUT a kol. 2000).

### **Southernův přenos (Southern blotting)**

Tato metoda byla poprvé popsána v roce 1975 a dnes patří k základním postupům molekulární biologie. Slouží k detekci specifických sekvencí DNA (ŽUROVEC a kol.

1999). Při této metodě dochází k přenosu DNA na membránu a následně k hybridizaci genomové DNA, která byla rozštěpena restriční endonukleázou, rozdělena elektroforézou a přenesena z agarózového gelu na nitrocelulóзовый filtr. Vlastní hybridizace se provádí s radioaktivně nebo neradioaktivně značenou sondou v roztoku. Vizualizace se provádí pomocí autoradiografie. Při použití neradioaktivně (chemiluminiscenčně) značené sondy, je možná přímá vizualizace. Metoda informuje o přítomnosti úseků DNA homologních se sondou a přibližně i o jejich počtu. Pomocí southernova přenosu je možno se přesvědčit o existenci určité sekvence (transgenu, transpozonu, jakéhokoli genu, unikátní nebo repetitivní DNA) v genomu (ONDŘEJ a DROBNÍK 2002).

## 2.5. Elektroforetické metody

Elektroforéza patří k nejpoužívanějším separačním technikám využívaným při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Poprvé byla popsána v roce 1909 Michaelisem (ERDELSKÝ a FRIC 1979).

Je to jednoduchá, rychlá a přitom vysoce citlivá analytická metoda, jež je založena na nestejně pohyblivosti elektricky nabitých částic v jednosměrném elektrickém poli. (ŠMARDA a kol. 2005). Míra pohyblivosti (mobility) částice závisí na gradientu napětí, na velikosti „čistého“ náboje částice, velikosti částice, jejím tvaru, na iontové síle, viskozitě a teplotě média, ve kterém se molekuly pohybují a v případě gelové elektroforézy i na případných interakcích mezi nosičem a částicí (ANDREWS 1993, HOEFER 1994).

Elektroforéza se může provádět přímo v roztoku („volně“) nebo ve vhodném nosiči.

### 2.5.1. Volná elektroforéza

V klasické tzv. "volné" technice se elektroforéza provádí ve vodných roztocích tlumivých roztoků (elektrolytu) a částice putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou rychlostmi, které jsou úměrné velikosti jejich náboje. Rychlost migrace a vzájemné oddělování částic je dáno též použitým gradientem napětí. Metoda je velice jednoduchá, ale její značnou nevýhodou je, že se separace snadno poruší konvenčními proudy v kapalině, které vznikají vlivem tepla, způsobeného průchodem elektrického proudu. Proto se této techniky používá velmi zřídka.



## 2.5.2. Elektroforéza na nosičích

Aby se odstranily nedostatky volné elektroforézy, tj. vznik konvenčních proudů a difuze, které výrazně zhoršují výsledky separace, začala se provádět elektroforéza na nosičích, nazývaná též **zonální elektroforéza**. Nosiče používané při elektroforéze musí být hydrofilní, nerozpustné ve vodě a měly by mít co nejmenší adsorpční schopnosti. Prvními použitými nosiči byly **neklížený papír** ( tzv. chromatografický ), **acetát celulosy**, **škrob** (nezgelovatěly ) a **celulosa**. V současné době se jako nosiče používají hlavně gely, a to zejména **agarosový gel**, **škrubový gel** a pravděpodobně nejčastěji **gel polyakrylamidový**.

### 2.5.2.1. Elektroforéza na papíře a acetylcelulóze

V dřívějších studiích byl papír poměrně často používán jako nosič pro separaci proteinů a dalších makromolekul. Nyní se však již od jeho používání upouští, z důvodů ne příliš velké homogenity ve velikosti pórů, elektroendoosmózy, malé pevnosti, a také proto, že některé materiály, zejména proteiny, jsou adsorbovány a výsledkem pak jsou široké proužky se špatným rozlišením (ANDREWS 1993).

Acetylcelulóza vykazuje výrazně uniformější velikost pórů nežli papír a nedochází ani k absorpci proteinů. Její rozlišovací schopnost se blíží rozlišení na polyakrylamidu a má oproti němu i řadu výhod. Mezi nejvýznamější patří snadná manipulace, minimum operací při přípravě gelu a minimální spotřeba chemikálií (ANDREWS 1993).

### 2.5.2.2. Gelová elektroforéza

Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku, ale ve vhodném nosiči, kterým bývá obvykle gel. Takovéto gely jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Tyto látky tvoří složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru .

Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, které mají deskové uspořádání a dále kapilární elektroforézu, u níž je gel uvnitř kapiláry (ŠMARDA a kol. 2005).

### ***Elektroforéza na agarózovém gelu***

Elektroforéza na agarózovém gelu je základní metodou pro identifikaci a separaci molekul a fragmentů DNA, které se nedají dělit jinými metodami jako je např. centrifugace v hustotním gradientu (TURŇA a kol. 1992).

Agaróza je lineární polysacharid tvořený  $\beta$ -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- $\beta$ -L-galaktopyranózou, které jsou spojeny glykozidovými vazbami (ŠMARDA a kol. 2005). Gel funguje jako molekulární síto, fragmenty se dělí podle velikosti – čím kratší, tím dále od startu migrují, přičemž fragmenty stejné délky vytvoří proužky. Pozici DNA na gelu zjistíme obarvením gelu ethidium bromidem a vizualizací UV světlem. Délky jednotlivých fragmentů určujeme kalibrací gelu pomocí standardů DNA známé délky.

Migrační rychlost závisí hlavně na velikosti molekuly DNA, na koncentraci agarózy, konformaci DNA a velikosti napětí (ŽUROVEC a kol. 1999).

Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 kb (ŠMARDA a kol. 2005).

### ***Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE)***

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu probíhá v nedenaturačním diskontinuálním PAGE systému (GRAMAN a kol. 1999). Gel je průhledný, pružný, termostabilní, velkou výhodou je možnost regulovat velikost pórů a nastavení hustotního gradientu v profilu gelu. Má nízký elektroosmotický potenciál, lze jej vysušit a získat tak permanentní stabilní záznam. Nevýhodou je však toxicita monomerů, nízký odpor gelů a chybějící počáteční viskozita roztoku (HOEFER 1994).

Polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul od 10 do 1000 bp (ŠMARDA a kol. 2005).

### ***SDS- PAGE***

Tato metoda je založena na elektroforéze komplexů denaturovaných polypeptidů s detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS). Navázáním SDS se nábojové rozdíly mezi proteiny vyruší, komplexy protein-SDS jsou v neutrálním a zásaditém prostředí silně negativně nabitě a směřují k anodě. Procházejí-li gelem o vhodné porozitě, je jejich pohyblivost dána téměř výhradně velikostí molekuly. Po srovnání s pohyblivostí standardů

o známé molekulové hmotnosti můžeme snadno a relativně přesně určit molekulovou hmotnost proteinů či jejich podjednotek.

SDS-PAGE lze použít především k analýze složitých směsí proteinů, pro určování molekulových hmotností a k získání informací o podjednotkovém složení daného proteinu (HOŘEJŠÍ 1985).



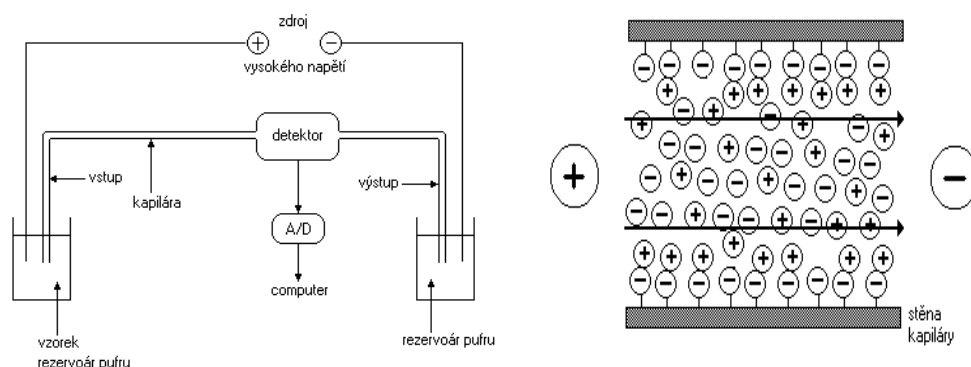
**Obr.4.: Základní uspořádání plošné elektroforézy**

#### ***Kapilární elektroforéza***

Zvláštním způsobem elektroforézy je tzv. kapilární elektroforéza, která využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry. Tomuto způsobu elektroforézy se říká vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) a provádí se několika způsoby - jako volná elektroforéza, gelová elektroforéza, ale i jako izoelektrická fokusace. Mezi její výhody patří: rychlost analýzy, možnost automatizace, vysoká citlivost a potřeba jen malého množství vzorku (VOET a VOETOVÁ1990)

- ***Volná kapilární elektroforéza ( free-zone capillary electrophoresis )***

Technika je založena na separaci látek v otevřené kapiláře naplněné elektrolytem. K separaci dochází kombinací vlivu elektroforetické migrace a elektroosmotického toku. Elektroforetickou migrací rozumíme pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Elektroosmotický tok je tok elektrolytu způsobený nábojem vnitřní stěny kapiláry a aplikovaným potenciálem (VOET a VOETOVÁ1990)



**Obr.5.: Stručné schéma kapilární elektroforézy a elektroosmotický tok kapilárou (převzato a upraveno HOEFER 1994).**

- ***Kapilární gelová elektroforéza***

Pracuje s kapilárou, naplněnou různými typy materiálů ( podle separované směsi ). Kapilára může být naplněna agarosou nebo polyakrylamidovým gelem. Tento typ elektroforézy má řadu společných rysů ( pokud jde o provedení ) s volnou kapilární elektroforézou. Je zde však několik významných rozdílů : separace vzorku nezávisí na toku elektrolytu ve směru elektrody, ale pouze na elektroforetickém pohybu nabitých molekul gelovou maticí směrem k elektrodě. Kromě elektroforetické pohyblivosti je při separaci důležitá také porosita použitého gelu, velikost separovaných molekul, poměr velikosti molekul a náboje a fyzikální dimenze roztoku. Svou roli při separaci hrají i faktory, které ovlivňují volnou kapilární elektroforézu, jako velikost napětí, délka a průměr kapiláry, pH a iontová síla elektrolytu. Pokud mají separované molekuly blízkou molekulovou hmotnost, rozlišitelnost na základě velikosti molekuly je malá. Je možno ji ale zvýšit přidáním organických rozpouštědel, chaotropních sloučenin nebo micel do elektrolytu. Tato činidla mění tvar, velikost a náboj separovaných molekul, takže mohou výrazně měnit schopnost separace.

- ***Isoelektrická fokusace (IEF)***

IEF je velmi účinnou technikou použitelnou pro separaci proteinů. Jejím principem je aplikace elektrického pole napříč stabilním gradientem pH. Všechny proteiny jsou typické svým izoelektrickým bodem pI, což odpovídá takovému pH, při kterém nemají

pozitivní ani negativní náboj. Při vyšších hodnotách pH než je pI ponese protein negativní náboj, při nižším pH než je pI ponese protein pozitivní náboj. Negativně nabité proteiny se v gradientu pH budou pohybovat k anodě dokud nedosáhnou takového pH, které odpovídá pI. V tomto bodě všechny náboje ztratí a jejich pohyb se zastaví. Naopak proteiny nabitě kladně se budou pohybovat ke katodě dokud nedosáhnou pI. Výsledkem tohoto procesu je zaostření každého proteinu do specifického bodu gradientu pH (ŠMARDA 2005).

Vzorky jsou extrahovány stejným způsobem jako pro účely PAGE. Fokusace probíhá v 1 mm gelech ve vertikálním uspořádání (GRAMAN a kol. 1995).

## **2.6. Vyhodnocování genetických markerů**

Významný je také způsob vyhodnocování získaných elektroforetických dat a způsob jejich interpretace. Výsledné spektrum proužků na gelu se nazývá elektroforetický fenotyp. Tento fenotyp je značně proměnlivý ve své komplexitě, závisí na řadě faktorů, např. druhu organismu, tkáni, analyzovaného enzymu nebo bílkoviny. V některých případech je tvořen pouze jedním nebo několika nevariabilními proužky, totožnými ve všech vzorcích. Naopak některé enzymy mohou být kódovány více geny a zobrazují se pak jako komplexní fenotyp s 15 – 20 i více proužky u jednoho jedince. Následující faktory se považují za primární determinanty počtu pozorovaných proužků: počet kódujících genů, jejich alelický stav (homozygotní nebo heterozygotní) (WEEDEN 1990).

### **Vyhodnocování získaných elektroforeogramů**

Pro vyhodnocování získaných elektroforeogramů je používána řada metod. Mezi nejjednodušší metody vhodné při malém množství analyzovaných vzorků a proužků je ruční měření gelů a stanovení relativní pohyblivosti jednotlivých isoenzymů nebo bílkovinných pruhů.  $R_f$  (relativní pohyblivost) se zjistí jako poměr vzdálenosti sledovaného pruhu a čela elektroforézy od startu. Pozici proužků lze i graficky znázornit (GRAMAN a kol. 1995). Získané  $R_f$  jsou uváděny ve formě tabulek nebo grafů, ve většině případů je při vyhodnocování výsledků používáno jen kvalitativní kritérium (přítomnost - nepřítomnost pruhu). Získaná data lze dále statisticky zpracovat. Výsledkem je pak výpočet podobností (dle různých algoritmů, závislých na použité

metodě výpočtu), uspořádání koeficientů podobnosti matice a pomocí clusterové analýzy uspořádání dat do formy dendogramu (ČURN a SÁKOVÁ 1996).

### **Denzitometrické vyhodnocení**

Digitalizovaná elektroforetická spektra jsou ukládána v počítačovém formátu a následně vyhodnocována s pomocí příslušného analytického softwaru (korekce gelů, výběr píků pro analýzu, stanovení relativní vážené homologie spektra neznámé odrůdy podle odrůd katalogizovaných v databance spekter, resp. genotypů) (ČURN a SÁKOVÁ 1996).

### **Digitální obrazová analýza gelů**

Velmi dobrých výsledků lze dosáhnout po důkladnější obrazové analýze gelů. Pro počítačové zpracování získaných elektroforeogramů, je používán barevný stolní scanner s vysokou rozlišovací schopností a speciální software - např. GelManager nebo Bioprofil 1D+.

Tyto programy jsou určeny zejména pro analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňuje konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány. Využití má zejména v epidemiologických studiích, identifikaci genotypů, systematice, ekologii, populační genetice, klinické biochemii a biotechnologických aplikacích (ČURN a SÁKOVÁ 1999).

### **Clusterová analýza**

Přehledným a ilustrativním výsledkem analýzy spekter je seskupení podobných spekter na základě výpočtu podobnostní matice – koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice jsou pak podrobeny clusterové analýze (UPGMA – unweighted pair group method, using averages) a výsledky zobrazeny jako dendrogram (GRAMAN a kol. 1995). Dendrogramy tak vyjadřují míru podobnosti mezi jednotlivými analyzovanými spektry, resp. skupinami spekter. Na ose x je udávána míra podobnosti nebo korelace (od 0,0 do 1,0). Spektra s korelací nad 0,9 jsou obecně nerozlišitelná v případě, že vzorky budou separovány na jednom gelu (ČURN a SÁKOVÁ 1999).

## **Porovnávání fingerprintů**

Po korekci, tj. odstranění variability v rámci gelu nebo mezi gely způsobené nestejnými podmínkami při elektroforéze (různá délka gelů, rozbíhání proužků) je možné porovnat spektra pomocí těchto technik:

*korelační koeficient* mezi hodnotami absorbančních profilů - dobrý ukazatel podobnosti komplexních fingerprintů, podobnost v tvaru dvou absorbančních profilů je měřena bez přímého efektu počtu a velikosti píků.

*jednoduchý koeficient podobnosti* mezi pozicemi proužků; algoritmus počítá, jak mnoho proužků u vybraných vzorků (spekter) se shoduje ve své pozici v rámci specifikovaného rozmezí. Tento koeficient je výhodné použít v případě vysoké reprodukovatelnosti spekter a v případě dobrého rozlišení proužků.

## **Statistické hodnocení primárních elektroforetických dat**

Hodnoty mobilit jednotlivých proužků, mohou být dále použita pro přesnější statistické zpracování a vyhodnocení podobnosti jednotlivých analyzovaných genotypů (odrůd) mezi sebou, sestavení podobnostních matic a případně pro grafické znázornění těchto podobností a vzdáleností mezi genotypy a odrůdami (grafy ve formě dendrogramů získané po clusterové analýze).

Při tomto typu statistického hodnocení elektroforetických dat lze použít řady metod jak pro výpočet podobností, resp. vzdáleností mezi analyzovanými elektroforetickými fenotypy, tak i pro tvorbu dendrogramů (clusterovou analýzu).

### 3. MATERIÁL A METODIKA

Vypracování této diplomové práce probíhalo v několika na sebe navazujících fázích. Nejprve byla optimalizována metoda pro extrakci DNA, poté byly provedeny jednotlivé analýzy a nakonec statistické vyhodnocení výsledků. Pro ověření schopnosti primerů detekovat genetickou variabilitu na různé úrovni bylo provedeno testování na souboru blízké příbuzných jedinců a souboru jedinců z různých geografických lokalit.

#### 3.1. Popis studovaného materiálu

Analýzy byly prováděny z pupenů a jehlic jedinců uvedených v následující tabulce v laboratoři Biotechnologického centra ZF JU. Pro detekci variability bylo vybráno celkem 6 populací rodu *Pinus* ze šesti evropských lokalit a to 5 jedinců z každé populace (Obr.3.1.: Mapa Evropy s vyznačením odběrových lokalit pro analýzy). Z každého jedince byl odebrán vzorek (větev) a vložen do sáčku a označen. Takto byl dopraven do laboratoře a ihned po převozu byl dále zpracován. Odebrané vzorky byly až do doby analýzy skladovány při teplotě -20°C.

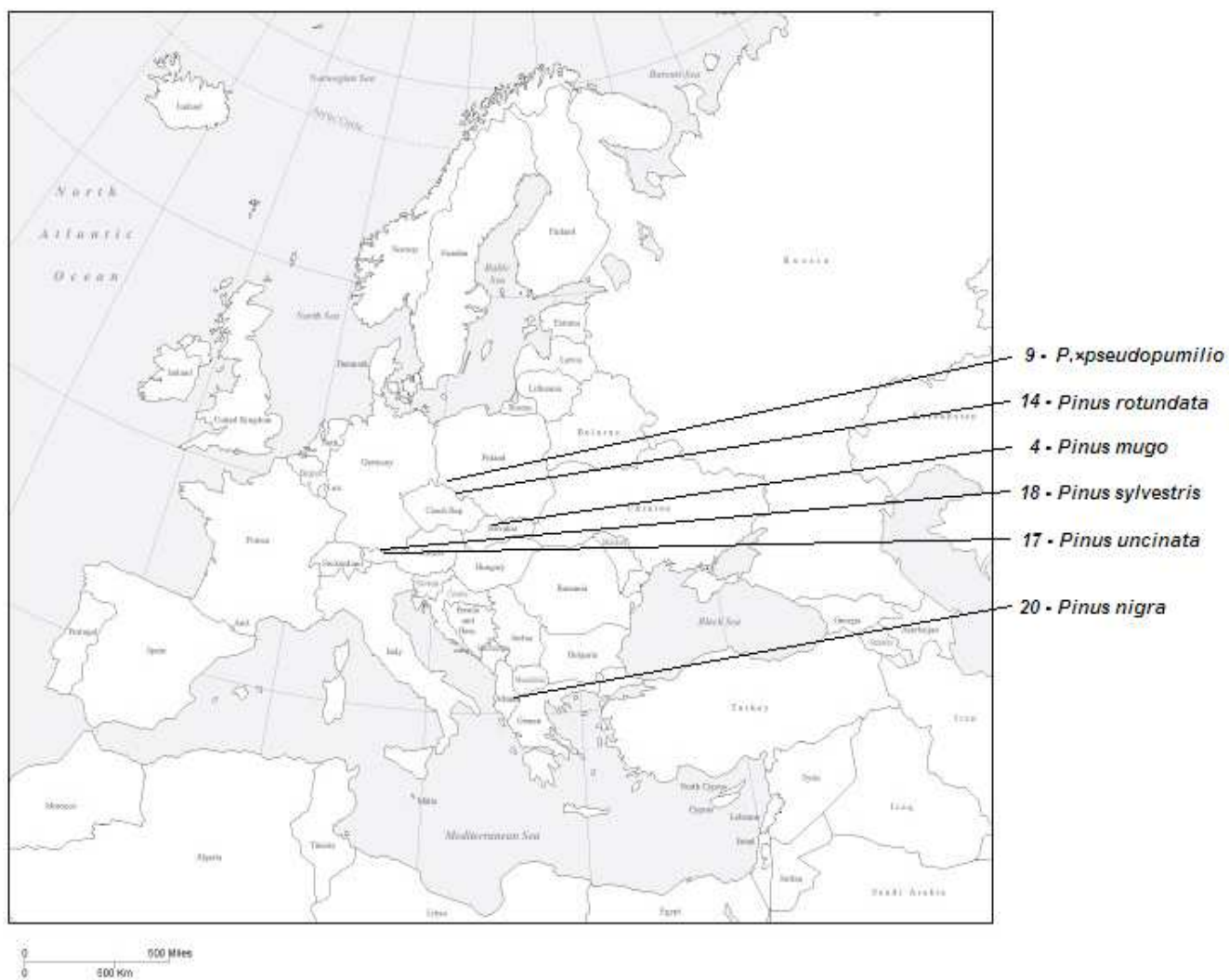
Lokality a další informace o sběru jsou uvedeny dále.

**Tab.1.: Přehled lokalit a informace o sběru vzorků analyzovaných populací**

Název	Číslo DNA vzorku	Lokalita sběru včetně GPS dat (WGS-84)	Nadmořská výška [m]	Počet analyzovaných jedinců	Datum sběru
<i>Pinus sylvestris</i>	18	Rakousko, Tirol, Reutte, Tannheimer Berge, J svah nad <b>Weissenbach am Lech</b> , 47°26'58"N/10°38'21"	980 - 1000	6	20.9.2002
<i>Pinus nigra</i>	20	Albánie, okr. Erseke, <b>Pindos</b> , Kamenikut, 40°13'15"N/20°39'25"E	1100	6	16.5.2005
<i>Pinus mugo</i>	4	Slovensko, Nízké tatry, Prašivá, Liptovská Lúžina, S svah pod vrcholem <b>Veľká hoľa</b> , 48°55'34"N/19°23'05"E	1590-1640	6	20.6.2003
<i>Pinus uncinata</i>	17	Rakousko, Tirol, Reutte, jez. <b>Plansee</b> , SZ úpatí Spiess, 47°27'49"N/10°48'05"E	980-1050	6	21.9.2002



<i>Pinus rotundata</i>	14	Polsko, Dolny Slask, <b>Wielkie Torfowisko Batorowskie,</b> 51°17'50"N/15°13'25"E	192	6	23.- 24.4.2003
<i>P.×pseudopumilio</i>	9	Polsko, Góry Bystrzyckie, <b>Torfowisko pod Zielencem</b> 50°20'57"/16°24'42"	760	6	22.5.2002



Obr.6.:Mapa odběrových lokalit analyzovaných populací.

## 3.2. Izolace DNA z rostlinného materiálu

Základním předpokladem úspěšných pokusů bylo dostatečné množství nedegradované DNA, která sloužila jako templát. Pro účely populační genetiky je navíc nutné získat templátovou DNA z každého vzorkovaného jedince zvlášť. Dalšími podmínkami jsou také rychlost a nenáročnost procedury, neboť je nutno testovat velké množství jedinců.

### 3.2.1. Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB (WILLIAMS a kol. 1992).

1. jehlice očistíme lihem (dvě jehlice cca 0,05g) a nastříháme do připravených mikrozkušavek na 0,5 cm, drtíme v třecí misce s N<sub>2</sub> nebo bez.
2. k rozdrčenému materiálu přidáme 700 µl CTAB + (modifikaci) + 500 µl chloroform:isoamylalkohol, inkubujeme 30 min při 60°C
3. centrifugujeme při max. ot 14000 po dobu 8 min
4. supernatant odpipetujeme do nové mikrozkušavky
5. přidáme 500 µl isopropanolu z mrazáku, vzorky vložíme na 15 min do mrazáku
6. centrifugujeme 20 min na max. ot.
7. slijeme isopropanol, promyjeme 96% alkoholem, centrifugujeme 3 min a alkohol vylijeme
8. promyjeme 70 % alkoholem, centrifugujeme, alkohol odsajeme
9. mikrozkušavky necháme vyschnout na buničině
10. k peletu přidáme 50 µl H<sub>2</sub>O

### 3.2.2. Modifikované metody izolace DNA z rostlinné tkáně založené na metodě CTAB

Izolace rostlinné DNA byla provedena z jehlic a pupenů výše uvedených druhů rodu *Pinus*. Pro počáteční srovnání byla zvoleno několik způsobů, z nichž ne všechny se osvědčily. Provedena byla Sorbitolova extrakce a Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB (WILLIAMS a kol. 1992) v jejímž protokolu byly provedeny drobné modifikace.

Prvním testovaným postupem izolace byla Sorbitolova extrakce, která však nebyla příliš úspěšná, získaná DNA nebyla dostatečně čistá a pro použití některým analýzám zcela nevhodná. Druhou metodou byla izolace pomocí CTAB, jejíž výtěžek byl podstatně vyšší a čistší. Jak již bylo řečeno v postupu této metody bylo provedeno několik modifikací od původního protokolu, z nichž byla vybrána ta, jejíž produkt se jevil jako nejvyrovnanější co do čistoty, množství a koncentrace izolované DNA.

Kvalita izolované DNA byla po každém postupu otestována na 0,8% agarózovém gelu.

Výše uvedeným požadavkům nejvíce vyhovovala metoda Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB podle Williamse (1992) s využitím modifikace číslo 13 (PVP + chelex + EDTA). Přesný postupy této izolace je uveden dále. Výtěžek vyizolované DNA byl zjištěn na spektrofotometru.

#### **Modifikace izolace:**

1. standardně dle protokolu ( s PVP)
2. bez PVP
3. PVP + EDTA 0,5 M (100  $\mu$ l)
4. PVP + DMSO (30  $\mu$ l)
5. PVP + chelex
6. PVP + DMSO + chelex
7. bez PVP + DMSO
8. bez PVP + chelex
9. bez PVP + EDTA
10. chelex + EDTA
11. PVP + DMSO + EDTA
12. PVP + EDTA + chelex + DMSO
13. PVP + chelex + EDTA

**Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB podle Williamse (1992) s využitím modifikace číslo 13:**

*Použité chemikálie:* 2X CTAB pufr (cetylamonium bromid) (nebo 2% merkaptoethanol), chloroform, isopropanol, 100% ethanol, 70% ethanol, PVP, EDTA 0,5 M, chelex.

*Postup:*

- 1.) Jehlice očistíme lihem (dvě jehlice cca 0,05g) a nastříháme do připravených mikroskumavek na 0,5 cm, rozdrtíme v třecí misce s N<sub>2</sub> nebo bez N<sub>2</sub>.
- 2.) K rozdrcenému materiálu přidáme 700 µl CTAB, dále PVP + chelex + EDTA (na špičku mikrolžičky). V digestoři přidáme 500 µl směsi chloroform:isoamylalkohol. Mikroskumavky dobře uzavřeme, 2-3x převrátíme a inkubujeme 30 minut na termomixeru při 60°C.
- 3.) centrifugujeme 20 min. při 14 000 rpm.
- 4.) Supernatant (průhledný, cca 500 µl) opatrně přepipetujeme do nových popsaných mikroskumavek (1,5 µl)
- 5.) Přidáme 500 µl vychlazeného isopropanolu, vzorky 1-2x převrátíme a vložíme na 15 min. do mrazáku (-20°C).
- 6.) Centrifugujeme 20 min. na 14 000 rpm.
- 7.) Supernatant opatrně slijeme do kádinky (v digestoři), na dně eppendorfky lze vidět drobný matně bílý pellet DNA, otevřené eppendorfky převrátíme dnem nahoru na filtrační papír.
- 8.) Přidáme 400 µl vychlazeného 96% ethanolu ( z mrazáku), centrifugujeme 3 min. a alkohol vylijeme.
- 9.) Přidáme 400 µl 70% ethanolu, centrifugujeme a alkohol opatrně odsajeme.
- 10.) Eppendorfky necháme vyschnout na buničině.
- 11.) K pelletu přidáme 50 µl sterilní Milli-Q vody.

### 3.2.3. Otestování kvality DNA na 0,8% agarózovém gelu

- 1.) připravili jsme 0,8% agarosový gel
- 2.) 4  $\mu$ l nenaředitelné DNA jsme smíchali s 1  $\mu$ l loading dye na kousku parafilmu a těchto 5  $\mu$ l jsme nanесли na gel
- 3.) jako žebříček byly nanесeny 3  $\mu$ l  $\lambda$

## 3.3. Analýza molekulárních markerů

### 3.3.1. RAPD analýza

Metoda RAPD je jednou z metod založených na PCR. Využívá toho, že do reakce vstupuje pouze jeden arbitrární primer o délce deset nukleotidů. Princio této metody je v tom, že se několikrát v celém úseku studované DNA stane, že primery nasednou na protiběžných řetězcích DNA v amplifikovatelné vzdálenosti od sebe (do cca 4 kb). V tuto chvíli je umožněna amplifikace části DNA mezi nimi.

PCR směs pro RAPD vypadala takto:

- sterilní Milli-Q voda.....7,5  $\mu$ l
- Master Mix.....12,5  $\mu$ l
- primer .....4  $\mu$ l
- studovaná DNA.....1  $\mu$ l

Zkumavky byly vloženy do termocykleru s následujícím programem:

1. 94°C.....5 min
2. 92°C.....1 min   ┌
3. 35°C.....2 min   krok 2. až 4. proběhl ve 45 cyklech
4. 72°C.....3 min   └
5. 72°C.....10 min
6. 4°C.....→ end

Produkty této reakce byly elektroforeticky rozděleny podle délky na 1,5% agarózovém gelu v TBE bufferu a vizualizovány pod UV světlem pomocí ethidiumbromidu.

### 3.3.2. PCR-RFLP

Tato metoda se skládá ze dvou kroků:

1. *amplifikace* konkrétního úseku DNA pomocí dvojice známých primerů. Bylo použito primerů, které jsou komplementární k začátkům a koncům kódujících genů okolo nekódující intergenické oblasti. Názvy primerů jež byly použity pro tuto reakci a jejich sekvence jsou uvedeny v následující tabulce.

2. *restrikce* (naštípání) namnoženého úseku pomocí enzymů zvaných restrikční endonukleázy, které specificky štěpí DNA.

Pomocí této metody hledáme polymorfismus v restrikčních místech nejruznějších endonukleáz a následně ho interpretujeme jako příbuznost či nepříbuznost organismů.

**Tab.2.: Názvy primerů a jejich sekvence**

Forward primer (5'-3')	sekvence	Revers primer (5'-3')	sekvence
ITS5*	(5'-3'): GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	26S25R	(5'-3'): TATGCTTAAACTCAGCGGGT
IT1	(5'-3'): TCCGTAGGTGAACCTGCGG	IT4	(5'-3'): TCCTCCGCTTATTGATATGC

#### **Protokol pro amplifikaci:**

PCR směs vypadala takto:

- PPP Master Mix.....12,5 µl
- primer ITS5\*.....0,25 µl
- primer 26S25R.....0,25 µl
- PCR voda (Top-Bio).....11 µl
- DNA.....1 µl

Zkumavky byly vloženy do termocyklieru s následujícím programem:

1. 94°C.....5 min
2. 95°C.....1 min     ┌
3. 55°C.....1 min     krok 2. až 4. proběhl ve 35 cyklech
4. 72°C.....1 min     └
5. 72°C.....7 min
6. 4°C.....→ end

Po proběhnuté reakci jsme otestovali kvalitu amplifikovaného PCR produktu všech deseti vzorků nanesením 5 µl na 1,5% agarózový gel v TBE bufferu. Do první jamky gelu byly naneseny 3 µl žebříčku (100bp ladder). Délka produktu byla zjištěna pomocí UltraQuant Software porovnáním s proužky DNA markeru.

Na gelu by měl být vidět jeden jasný proužek, bez kratších či delších nespecifických proužků, délky odpovídající očekávané délce PCR produktu.

Jelikož se v PCR produktu objevily nespecifické (nedefinovatelné) proužky, byly fragmenty z gelu vyříznuty a po jejich purifikaci byly použity pro sekvenování.

### **Purifikace PCR produktu z agarózového gelu**

PCR produkty separované na agarózovém gelu byly použity pro sekvenování. Proužky o příslušné velikosti byly vyříznuty z gelu a purifikovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, SRN) podle návodu výrobce.

#### *Protokol pro purifikaci PCR produktu z agarózového gelu:*

- 1) Z gelu byly skalpelem vyříznuty jednotlivé fragmenty, vloženy do mikrozkuavky a označeny.
- 2) Do každé mikrozkuavky bylo přidáno na 100 mg fragmentu 300 µl L1, mikrozkuavky byly uzavřeny a vloženy do termoboxu na 15 min. při 50 °C, během rozpouštění 3x protřepeme.
- 3) Jednotlivé fragmenty přelijeme přes předem označené kolonky a centrifugujeme 1 min. při 14000 rpm. Spodní zkumavku slijeme, filtr vrátíme (templát zachycen na filtru).

- 4) Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l L2, následně centrifugujeme 1 min. při 14000 rpm, supernatant slijeme a opět centrifugujeme 1 min. při 14000 rpm.
- 5) Spodní zkumavku odstraníme a filtr přeneseme do nové mikrozkušavky. Ke vzorku přidáme 50  $\mu$ l sterilní Milli-Q vody, filtr odstraníme a zkumavku vložíme na 2 min. do centrifugy při 14000 rpm.
- 6) Templát uchováme v mrazáku do upotřebení.

### 3.3.3. Sekvenování

Sekvenovány byly produkty PCR-RFLP. Pro sekvenování byly použity stejné primery jako pro PCR-RFLP. Fragменты DNA byly osekvenovány z obou stran a porovnány s databází GenBank.

Tato technika proběhla ve třech fázích:

#### 1. Příprava templátu

- *Přečištění fragmentu*

Produkty byly vyříznuty z gelu a fragmenty přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kit podle výše popsáního protokolu.

- *Měření koncentrace a ředění DNA na koncentraci potřebnou pro sekvenování*

Do sekvenační reakce je potřeba přidat vhodné množství templátové DNA, proto byla měřena koncentrace purifikovaného PCR produktu při 260 nm a 280 nm. Koncentrace DNA se pohybovala od 8 do 52 ng/ $\mu$ l.

Množství DNA potřebné pro reakci bylo odečteno z tabulky dodávané výrobcem sekvenačního kitu. Toto množství závisí na typu DNA (jedno nabo dvouvláknová) a na velikosti fragmentu. Pro PCR produkt o délce 200-500 bp odpovídá této koncentraci 3-10 ng a pro PCR produkt o délce 500-1000 bp odpovídá této koncentraci 5-20 ng templátové DNA.

#### 2. vlastní sekvenační reakce (cycle sequencing)

Sekvenováno bylo pomocí kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit od firmy ABI.

Sekvenační reakce byla napipetována podle následující tabulky:



	celá reakce
Ready Reaction Mix	8 µl
primer	3,2 pmol
templátová DNA	.....
Sequencing Biffer 5x	0 µl
voda	.....
celkový objem	20 µl

Sekvenováno bylo vždy jen s jedním primerem (umožní číst cca 450-550 bazí). Pokud byl sekvenován delší úsek než cca 500 bazí, bylo třeba provést dvě sekvenační reakce s různými primery (*forward* a *reverse*). Množství templátové DNA bylo napipetováno podle následující tabulky.

templát (PCR produkt)	množství
<b>100-200 bp</b>	1-3 ng
<b>200-500 bp</b>	3-10 ng
<b>500-1000 bp</b>	5-20 ng
<b>1000-2000 bp</b>	10-40 ng

Vodou bylo doplněno do 20 µl, všechny složky promíchány a lehce stočeny. Vzorky byly vloženy do PCR cykleru s následujícím programem:

1. 96 °C.....1 min
2. 96 °C.....10 sec   ┐
3. 50 °C.....5 sec   krok 2. až 4. proběhl ve 25 cyklech
4. 60 °C.....4 min   ┘
5. 4 °C.....hold

### 3. precipitace produktu

DNA byla precipitována podle protokolu dodávaného výrobcem sekvenačního kitu.

*Protokol pro precipitaci produktu:*

- 1) Ke 20  $\mu$ l produktu byly přidány 2  $\mu$ l 3M NaOAc (acetát sodný) a 50  $\mu$ l 96% ethanolu. Vše bylo promícháno a ponecháno stát při laboratorní teplotě 10-15 minut.
- 2) Vzorky byly okamžitě stočeny v předchlazené centrifuze (4 °C) při 13 200 rpm na 30 minut.
- 3) Supernatant byl ihned **opatrně** (precipitát není vidět) odstraněn.
- 4) Pelet byl dvakrát promýván 250  $\mu$ l 70% ethanolu a vzorky byly centrifugovány 15 minut při 13 200 rpm a 4 °C.
- 5) Supernatant byl odstraněn a pelet vysušen 15 až 20 minut při 37 °C (na termobloku).

Precipitované vzorky ve vysušené formě byly analyzovány v Laboratoři genomiky AV ČR/BF JU.

Výsledky byly porovnány s dostupnými sekvencemi databáze GenBank.

### **3.3.4. Mikrosatelitní markery**

Mikrosatelitní markery (SSR – Simple Sequence Repeats, STR – Short Tandem Repeats), které byly v této práci použity k detekci variability genotypů *Pinus mugo* agg. jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů 1 – 6 nukleotidů. např. (GA)<sub>n</sub>. Mikrosatelity se řadí k metodám lokusovým, kdy se sleduje jen určité, předem definované místo v genomu a k metodám amplifikačním, kdy je fragment DNA namnožen pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Umožňují rozlišení homozygotů (1 fragment) a heterozygotů (2 fragmenty). Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR bylo použito k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi.

Pro detekci variability bylo vybráno 6 geograficky vzdálených populací r. *Pinus*. Testováno bylo pět jedinců z každé populace. K dispozici bylo celkem šest primerů o známé nukleotidové sekvenci, jež byly komplementární k začátkům a koncům kódujících genů okolo nekódující intergenické oblasti.

Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci o celkovém objemu 25 $\mu$ l má následující složení:

- sterilní Milli-Q voda.....11,00  $\mu$ l
- PPP Master Mix.....12,50  $\mu$ l
- 5'primer.....0,25  $\mu$ l
- 3'primer.....0,25  $\mu$ l
- templátová DNA.....1,00  $\mu$ l

Zkumavky byly vloženy do termocycleru s následujícím programem o teplotním profilu dle použitého primeru:

- 1) 94°C.....1 min
- 2) 94°C.....1 min  $\lrcorner$
- 3) 50-65°C.....1 min krok 2. až 4. proběhl ve 45 cyklech
- 4) 72°C.....1 min  $\lrcorner$
- 5) 72°C.....3 min
- 6) 4°C..... $\rightarrow$

Celý objem PCR produktů byl nanášen na 2 % agarosový gel a následně byly produkty separovány na horizontální elektroforéze při 80V v 1x TBE pufru až 2,5 hodiny. Na gel byl přidáván marker 100bp DNA Marker (NEB). Amplifikovaná DNA byla analyzována pod UV zářením.

Získané elektroforeogramy byly vyhodnoceny pomocí binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 absenci produktu. Dále byly tyto výsledky statisticky zpracovány programem MVSP (Kovach Soft.) a následně byl sestaven dendrogram a ordinační diagram.

### 3.4. Příprava reagensí

#### 2 x CTAB s PVP (polyvinylpyrolidon)

chemikálie	g / 1000 ml
2% CTAB	20
100 mM Tris	12,114
20 mM EDTA	7,44
1,4 M NaCl	81,83
1% PVP 40	10

#### 5 x pufr TBE

Tris base	54 g
Kyselina boritá	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml

Rozpusťit v 800 ml destilované vody a dovést objem do 1000 ml.

#### 1 x pufr TBE

100 ml 5 x TBE dovést destilovanou vodou do 500 ml.

#### 1,5 % agarózový gel

agaróza	1,5 g
1 x TBE	100 ml
<u>EtBr</u>	<u>2 µl</u>

Po rozpuštění směs krátce povařit.

#### 2 % agarózový gel

agaróza	2 g
1 x TBE	100 ml
<u>EtBr</u>	<u>2 µl</u>

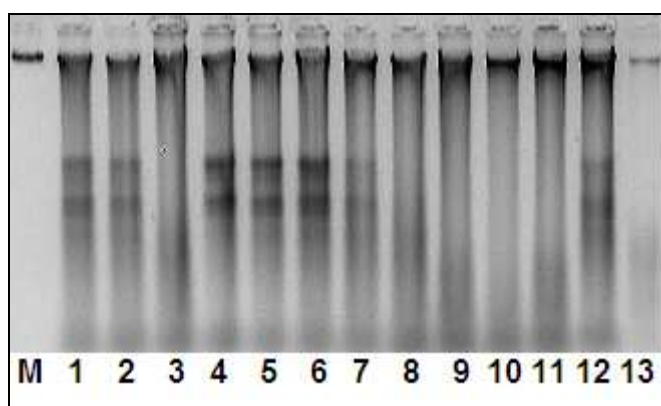
Po rozpuštění směs krátce povařit.

## 4. VÝSLEDKY

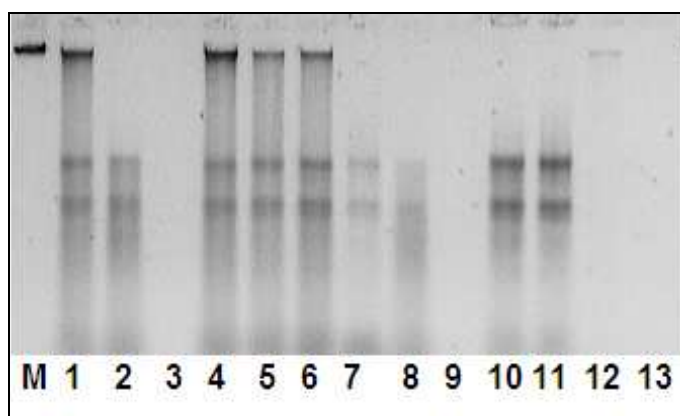
### 4.1. Izolace DNA

Ze dvou základních odzkoušených metod izolace DNA (Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB podle Williamse (1992) a Sorbitolova extrakce) nejvíce vyhovovala metoda izolace rostlinné DNA pomocí CTAB podle Williamse (1992) u níž byla provedena drobná modifikace (13.- přidáno PVP + chelex + EDTA).

**Obr.7.: Elektroforeogram DNA izolované metodou CTAB podle Williamse (1992) (čísla vzorků korespondují s číslem modifikace)**



**Obr.8.: Sorbitolova extrakce (čísla vzorků korespondují s číslem modifikace)**

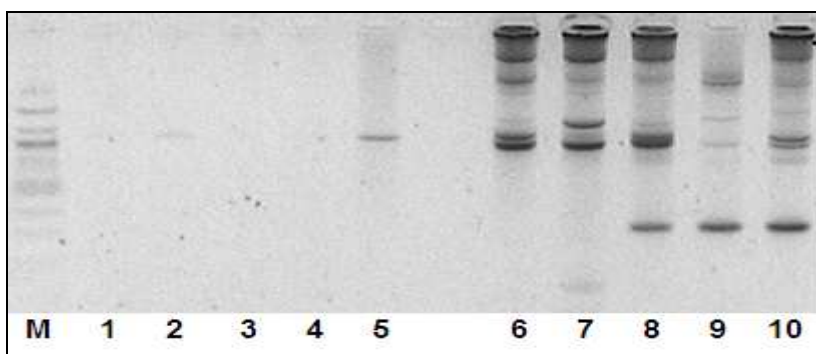


## 4.2. PCR-RFLP

ITS primery byly zkoušeny na populacích *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris*. Názvy a sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 2. DNA použitá pro reakci byla izolována z jehlic a pupenů výše uvedených populací.

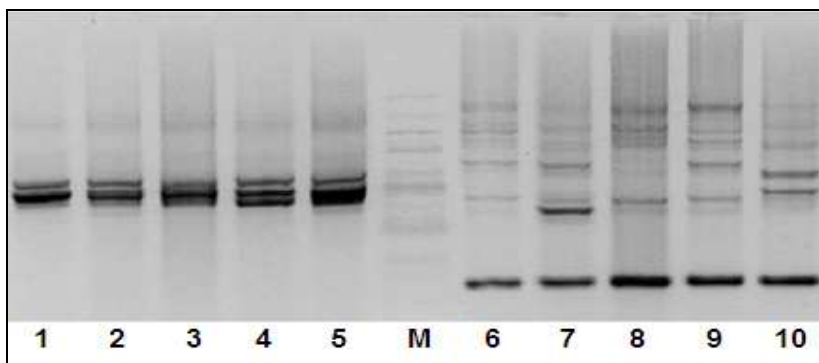
### Obr.9.: Výsledný elektroforeogram.

Vzorky 1 – 5 : IT1 + IT4; vzorky 6 – 10 : 26S25R + IT5\*



Pro reakci byla použita DNA *Pinus mugo* izolovaná z pupenů. Po vizualizaci se na gelu objevilo velké množství nespecifických pruhů, proto byla reakce provedena znovu. Byla použita DNA izolovaná z jehlic *Pinus sylvestris*.

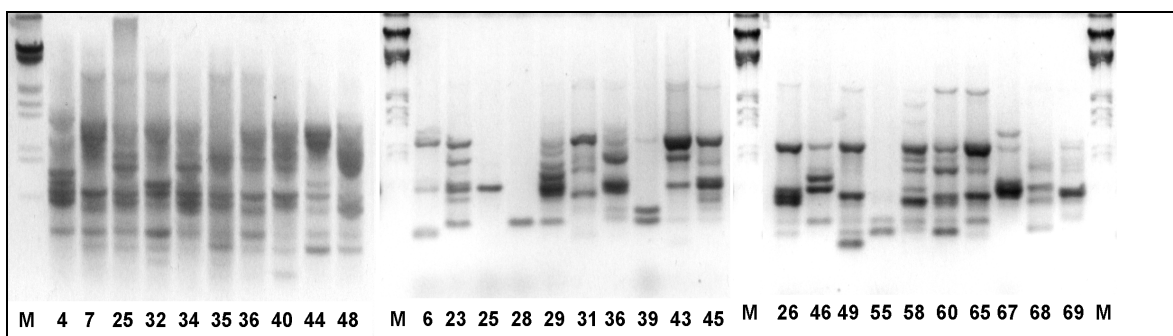
### Obr.10. ITS produkty na snímku po elektroforéze.



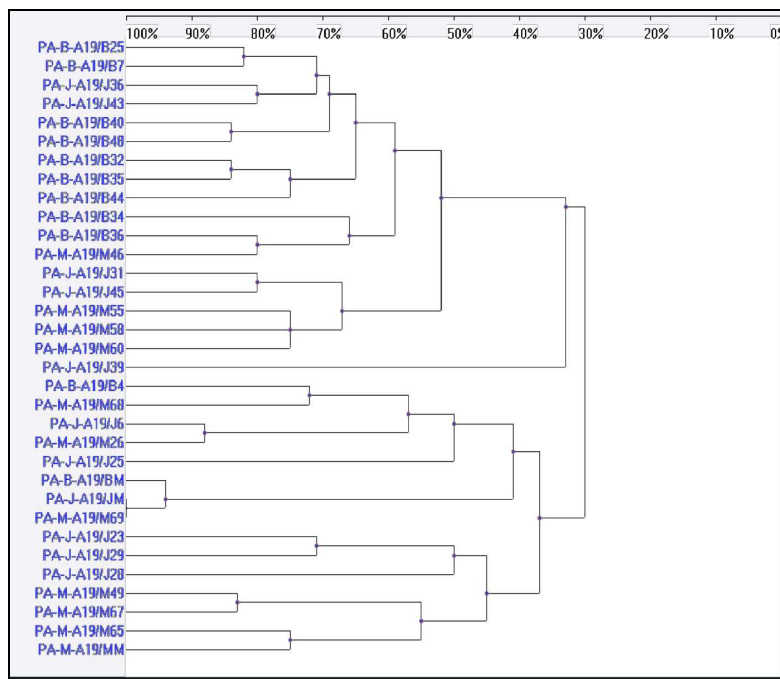
Pro reakci byla použita DNA izolovaná z jehlic. Vybrané fragmenty byly purifikovány z gelu, namnoženy pomocí PCR a použity pro sekvenování.

### 4.3. RAPD analýza

Byla provedena analýza celkem se 60 primery – náhodné primery Operon, kity OP-A, OP-B a OP-F. Charakteristické pro získané výsledky je velmi vysoká variabilita v rámci jednotlivých geografických populací i mezi populacemi navzájem. Příklad výsledků – spektrum RAPD a dendrogram je uveden na následujících obrázcích, kde je patrné velmi polymorfní spektrum markerů a prolínání jednotlivých populací po digitální analýze gelů a jejich statistickém zpracování.



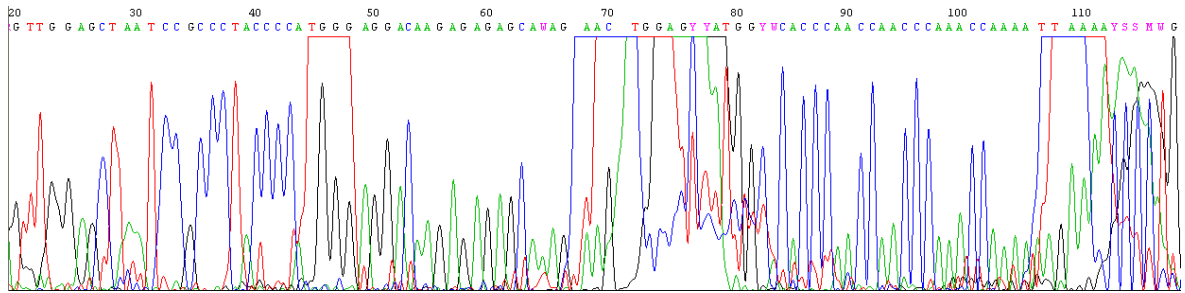
Obr.11.: Spektrum RAPD markerů (primer OPA-19) u vybraných jedinců populací *Pinus uncinata*, *Pinus rotundata*, *Pinus rotundata*.



## 4.4. Sekvenování

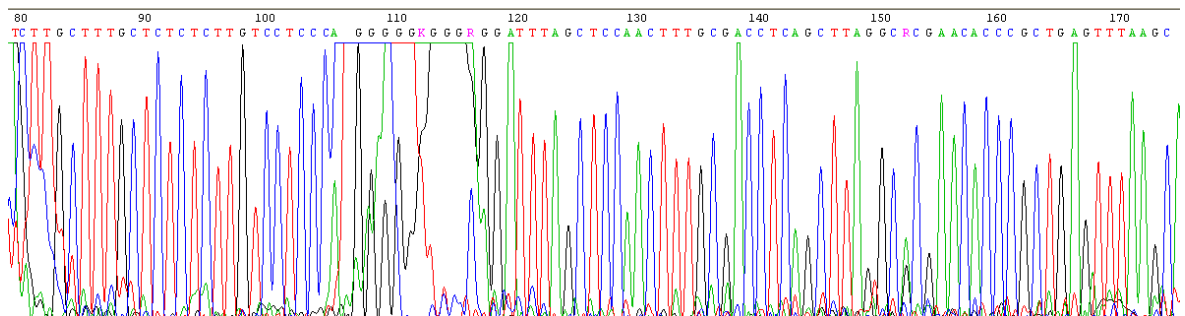
Výsledky sekvenování byly porovnány se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank. Po provedení PCR reakce byly při použití primerů GYM získány jednotlivé pruhy o velikosti cca 300 bp (na gelu byl zřetelný 1 pruh o této velikosti). Po sekvenační analýze a porovnání získaných výsledků s databází GeneBank byly tyto produkty amplifikace identifikovány jako ITS oblasti z rodu *Pinus*. Naopak po provedení PCR reakce s univerzálními primery ITS1-ITS4 bylo získáno více amplifikačních produktů (2-5) a po provedení sekvenační analýzy byly tyto produkty identifikovány jako ITS oblasti různých druhů fytopatogenních a endofytních hub.

### Blast 4 : vzorek 29 –*Pinus sylvestris*, primer 26S25R



[AF037003.1](#) *Pinus sylvestris* internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete sequence 95%

### Blast 9: vzorek 29 –*Pinus sylvestris*, primer IT5\*



[AF037003.1](#) *Pinus sylvestris* internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete sequence 92%



**Blast 15:** vzorek 3/1 –*Pinus sylvestris*, primer IT4

<a href="#">DQ317340.1</a>	Dothioraceae sp. BC10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	70%
<a href="#">DQ093678.1</a>	Sydowia polyspora isolate aurim1179 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	70%

## 4.5. Mikrosatelitní markery

Celkem bylo analýze podrobena 30 jedinců ze šesti evropských lokalit.

**Tab.3.: Přehled analyzovaných jedinců**

druh	číslo populace	číslo vzorku				
		3	16	24	29	30
<i>Pinus sylvestris</i> L.	18	3	16	24	29	30
<i>Pinus nigra</i>	20	7	12	13	22	25
<i>Pinus mugo</i> Turra	4	6	7	8	9	15
<i>Pinus rotundata</i> Link	14	8	7	11	12	16
<i>Pinus uncinata</i> Ramond	17	4	7	9	12	17
<i>P. × pseudopumilio</i> Willk.	9	6	15	17	31	34

### Optimalizace podmínek metodiky SSR

Metodika SSR klade velký důraz na optimalizaci podmínek reakce, především bylo důležité stanovit pro každý primer vhodný teplotní profil.

Názvy primerů jež byly použity pro tuto reakci jsou uvedeny v následující tabulce.

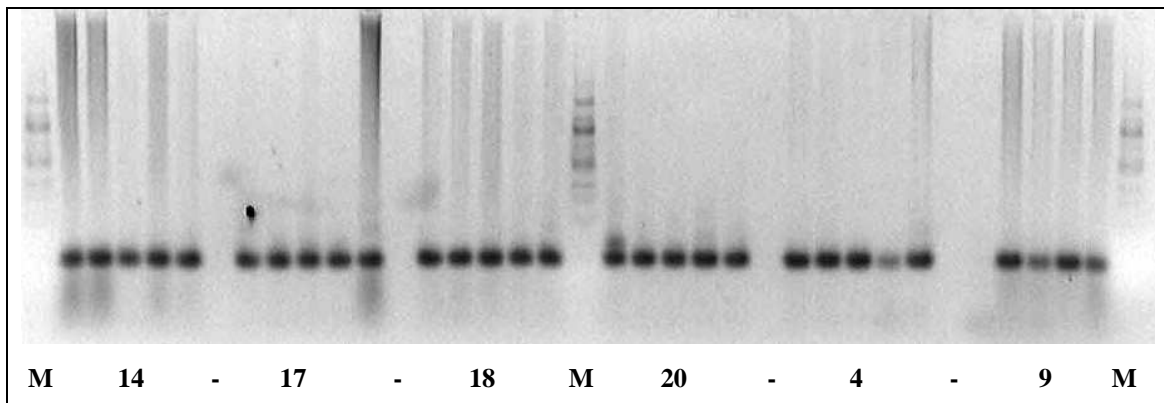
**Tab.4.: Seznam primerů použitých pro SSR**

primer	teplota annealingu [°C]
Powell 1,2	60
SPAC 11,6 R,F	52
SPAC 11,8 R,F	55
SPAC 12,5 R,F	55
SPAG 7,14 R,F	60
PtTx 3116 R,F	55

## Fingerprinty a datová matice

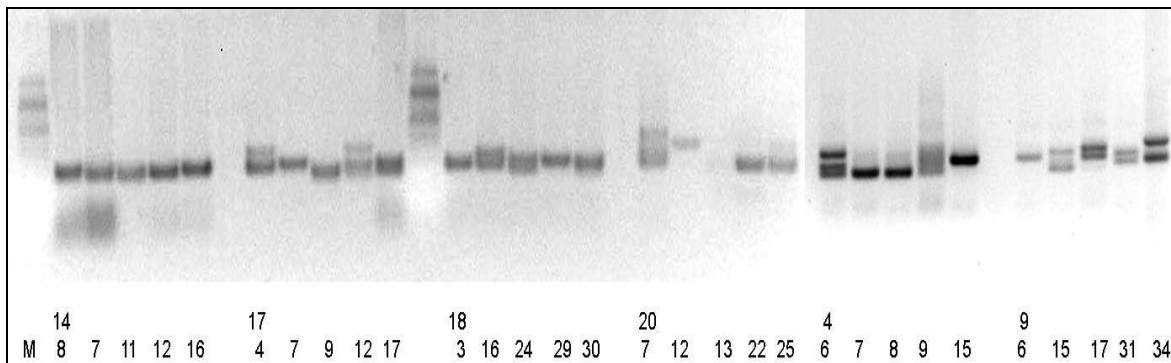
Fingerprinty genomu analyzovaných rostlin byly získány po proběhnutí PCR reakce, agarózové elektroforéze a vizualizaci DNA fragmentů. Na obrázcích 12 až 17 jsou demonstrovány fotografie gelů.

**Obr.12.: SSR produkty na snímku po elektroforéze (primer Powell 1,2)**



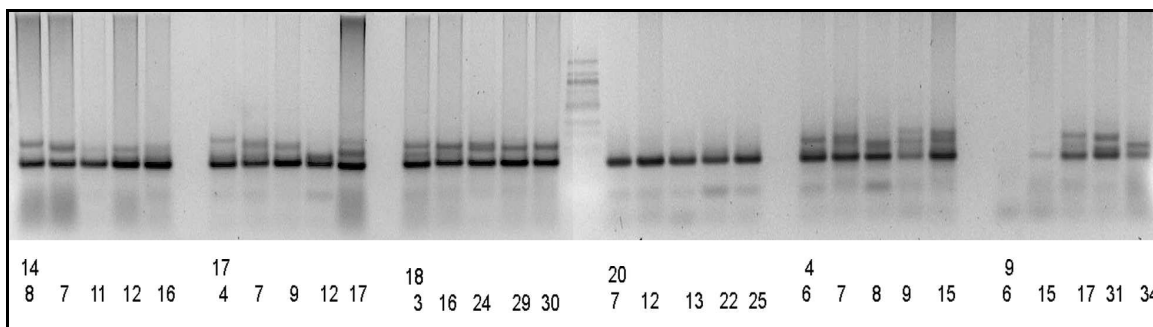
Z obrázku je patrné, že primer Powell 1,2 vykazuje monomorfní charakter, neboť pozice i intenzita generovaných proužků jsou u jednotlivých vzorků téměř shodné. Na jeden vzorek připadá 1 proužek.

**Obr.13.: SSR produkty na snímku po elektroforéze (primer PtTx 3116)**



Tento primer můžeme považovat za polymorfní. Na jeden vzorek připadá v průměru 0-2 proužky.

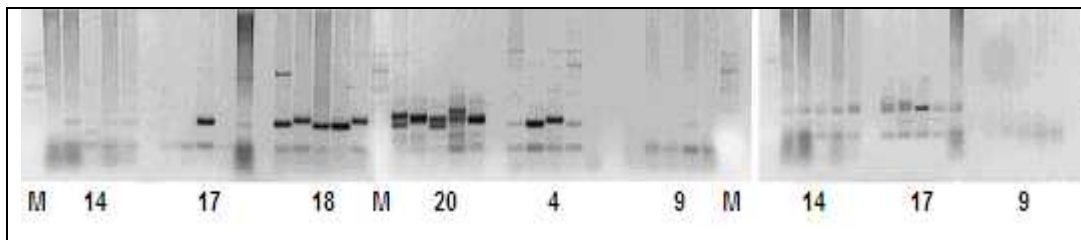
**Obr.14.: SSR produkty na snímku po elektroforéze (primer SPAC 11,6)**



Tento primer můžeme považovat za polymorfní. V průměru 1 až 3 proužky připadají na jeden vzorek.

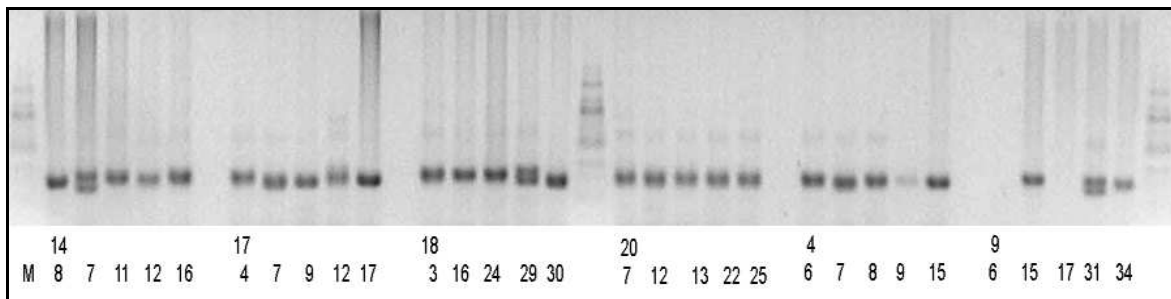
**Obr.15: SSR produkty na snímku po elektroforéze (primer SPAC 11,8)**

Reakce které nebyly úspěšné byly provedeny znovu (14\*, 17\*, 9\*)



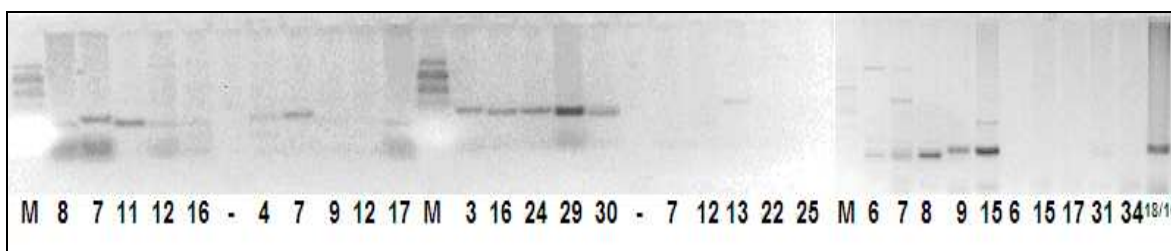
U populací číslo 18 20 a 4 primer jistý polymorfismus vykazoval, ovšem populace 14, 17 a 9 od sebe nebylo možné pomocí tohoto primeru odlišit. Na jeden vzorek připadá v průměru 1-3 proužky.

**Obr.16.: Elektroforeogram získaný po použití primeru SPAC 14,5**



Primer SPAC 14,5 vytváří spektrum proužků o různé velikosti. Počet proužků připadající na jeden vzorek se pohybuje v průměru od 1–2. Tento primer je polymorfní.

**Obr.17.: Elektroforeogram získaný po použití primeru SPAC 12,5**



Na jeden vzorek připadá v průměru 1 proužek. Tento primer můžeme považovat za poměrně polymorfní.

Výsledky po analýze mikrosatelitů – gely byly vyhodnoceny a byla sestavena tabulka a matice přítomnosti jednotlivých pruhů ve sledovaných vzorcích. Tato data byla následně statisticky vyhodnocena a byly spočteny matice genetické vzdálenosti a po clusterové a ordinační analýze byly výsledky vyjádřeny ve formě dendrogramů a ordinačních diagramů.

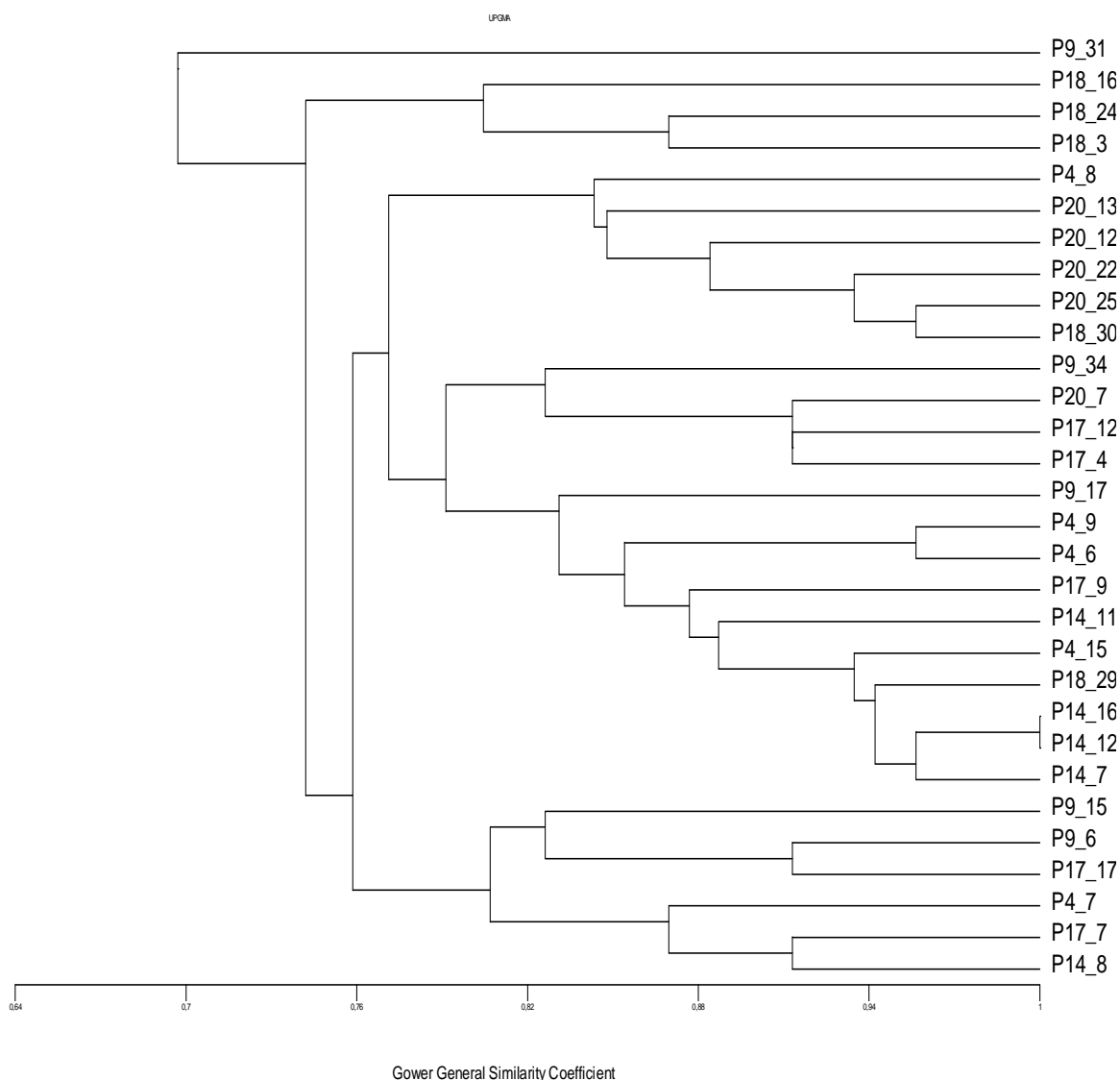
**Obr.18.: Elektroforetická data byla zapsána ve formě datové matice obsahující 1 - přítomnost pruhu a 0 - nepřítomnost pruhu**

	Pinus rotundata					Pinus uncinata					Pinus sylvestris					Pinus nigra					Pinus mugo					P. x pseudopumilio				
	POP 14					POP 17					POP 18					POP 20					POP 4					POP 9				
	8	7	11	12	16	4	7	9	12	17	3	16	24	29	30	7	12	13	22	25	6	7	8	9	15	6	15	17	31	34
Powell	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PtTx3116	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
SPAC11.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
SPAC11.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SPAG14.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	
	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

## Dendrogramy

Data zapsána do matice (1/0) byla podrobena clusterové analýze (program MVSP).

Výsledky jsou zobrazeny ve formě dendrogramu.



**Legendy:**

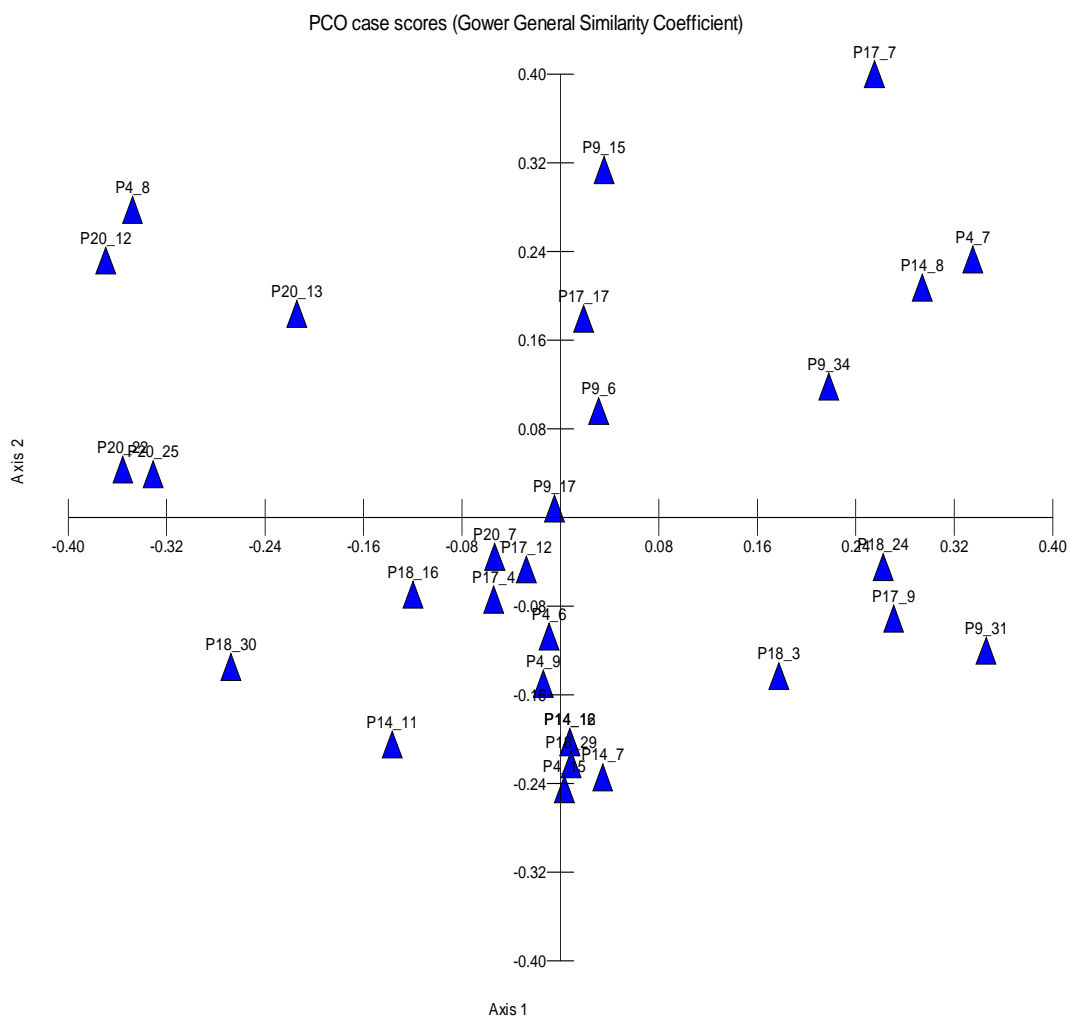
- P14 – *P. rotundata* (polská populace)
- P17 – *P. uncinata* (rakouská populace)
- P18 – *P. sylvestris* (rakouská populace)
- P20 - *P. nigra* (albánská populace)
- P4 - *P. mugo* (slovenská populace)
- P9 - *P. × pseudopumilio* (*jaká populace*)

Na tomto obrázku je znázorněn dendrogram zkonstruovaný z dat získaných analýzou všech šesti SSR primerů pomocí metody UPGMA. Je z něho patrné, že rakouská

populace *P. sylvestris* (18) vykazuje největší genetickou vzdálenost s polskou populací *Pinus rotundata* (14).

Dále je patrné, že míra vnitropopulační variability je velmi vysoká a překračuje úroveň mezipopulační variability – dochází k „prolínání“ populací a vzorky z jedné populace jsou zařazeny do různých clusterů. Tyto výsledky ukazují na vysokou míru variability ve sledovaných populacích.

Obdobný charakter výsledků byl získán po provedení ordinační analýzy – na následující obrázku je uveden ordinační diagram a výsledky PCO analýzy.



## 5. DISKUSE

Agregát *Pinus mugo* je vysoce polymorfní mnohotvárný taxon. Co se týče taxonomické interpretace, mezi různými autory však panuje velká nejednotnost. Podle taxonomické interpretace Businského (1999) je agregát *Pinus mugo* reprezentován souborem tří základních druhů, resp. mikrospecií, s těmito platnými jmény: ***Pinus mugo Turra (1764)***, ***Pinus uncinata Ramond in Lamarck et De Candolle (1805)*** a ***Pinus rotundata Link (1827)***. V převážné části starší literatury je však členěný jen ve dvě subspecie. Například Christensen (1987) člení *P. mugo* na *P. mugo* subsp. *mugo* Turra (kosodřevina) a *Pinus mugo* subsp. *uncinata* Ramond. Holubičková (1965) dále *P. mugo* Turra člení do subspecií *P. mugo mugo* a *P. mugo pseudopumilio* a *P. uncinata* Ramond člení na *P. uncinata* a *P. rotundata*.

V dalších klasických dendrologických dílech například Shaw (1914) a Rehder (1940) tyto druhy tvořící agregát *Pinus mugo* hodnotí jako vnitrodruhové taxony nejčastěji v kategorii variety. Svoboda (1953) je řadí jen do kategorie formy, respektive mimo kategorie botanické nomenklatury – tj. v pojetí klimatypů. Von Tubeuf (1912) pak člení *Pinus mugo* na *arborea* a *prostrata* a Holubičková (1965) dále *P. mugo* Turra člení do subspecií *P. mugo mugo* a *P. mugo pseudopumilio* a *P. uncinata* Ramond člení na subspecie *P. uncinata* a *P. rotundata*.

U borovic se můžeme setkat také s hybridizací, jak uvádí například Richardson (1993), nevyskytuje se však u všech skupin. V Evropě může být takovým příkladem, jež je relativně často kříží právě *Pinus mugo* agg.. Christensen (1987), Christensen a Dar (2003), Wachowiak a kol. (2005) shodně uvádějí, že hybridizace zde probíhá jak u blízce příbuzných druhů tak i s některými méně příbuznými druhy, např. s *P. sylvestris* méně často pak s *P. nigra*.

Z velkého počtu hybridních populací rodu *Pinus* popsanych Businským (1999) je patrné, že tyto druhy jsou velmi variabilní. Tato variabilita může souviset s jejich vysokou plastičností (schopností měnit svůj fenotyp v závislosti na změně podmínek prostředí). Bachmann (1992) je přesvědčen, že chloroplastová DNA (cpDNA) pro svou velikost, méně častější změny v genomu a pro relativně pomalou evoluci sekvencí cpDNA, je jedním z nejvhodnějších markerovacích systémů.



Izolace DNA byla provedena z listové tkáně, metodou CTAB podle Williamse (1992). Tato metoda je snadná, poměrně rychlá a komerčně dostupná. Získaná DNA je vhodná nejen pro PCR analýzu, ale i pro metody odvozené od PCR: RAPD, PCR - RFLP, AFLP. K její izolaci je však třeba používat naprosto čistý vzorek analyzovaného jedince, který vyloučí kontaminaci vzorku jiným organismem.

K ověření vhodnosti použití molekulárních markerů pro účely hodnocení genetické variability v rámci agregátu *P. mugo* byla použita **RAPD** (random amplified polymorphic DNA) analýza, vytvářející fylogeneticky konzervované produkty, specifické pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA (WILLIAMS a kol., 1990). Spektrum RAPD produktů bylo získáno po elektroforéze na agarózovém gelu. Primární molekulární data byla vyhodnocena pomocí digitální obrazové analýzy a softwarové analýzy (*BioProfil* a *Statistica*).

RAPD markery byly úspěšně používány v genetickém fingerprintingu, při analýze odrůd různých druhů (DEMEKE a kol., 1992; JAIN a kol., 1994). Dále jsou využitelné při analýze původů (SCOTT a kol., 1992; LERCETEAU a kol., 1997) a genetickém mapování (REITER a kol., 1992; UZUNOVA a kol., 1995).

Bachmann (1992), Williams a kol. (1993), Štorchová (1997), Sáková a Čurn (1998) se shodují v názoru, že RAPD analýza se osvědčila jako rychlá a jednoduchá metoda identifikace genotypů, pro porovnávání různých populací rostlin a ke studiu vnitropopulační a mezipopulační variability. Jak uvádějí ve svých studiích Carlson a kol. (1991); Bucci & Menozzi (1993); Nelson a kol. (1994) a Lu a kol. (1995), detekují RAPD markery, ve srovnání s isoenzymy vyšší úroveň polymorfismu a jsou vhodným systémem pro hodnocení genetické variability. Výsledky studií použití RAPD techniky například u *P. sylvestris* (SZMIDT, WANG a LU 1996) toto potvrzují. U *Pinus mugo* je pro získané výsledky charakteristická velmi vysoká variabilita v rámci jednotlivých geografických populací i mezi populacemi navzájem. Nicméně dochází k prolínání jednotlivých populací po digitální analýze gelů a jejich statistickém zpracování.

Metoda **PCR-RFLP** kombinuje amplifikaci určitého specifického úseku genomové DNA a následné štěpení amplifikovaného produktu různými restrikcčními endonukleázami. Po elektroforetické separaci na gelu lze detekovat polymorfismus uvnitř sekvencí, které se jinak v počtu bází příliš neliší. ITS polymorfie je známa také u zvířat a hub (O'DONNELL a CIGELNIK, 1997; HARRIS a CRANDALL, 2000).

ITS primery byly zkoušeny na populacích *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris*. DNA použitá pro reakci byla izolována z jehlic a pupenů výše uvedených populací. Nejprve byla použita DNA *Pinus mugo* izolovaná z pupenů. Po vizualizaci se na gelu objevilo velké množství nespecifických pruhů, proto byla reakce provedena znovu. Byla použita čistší DNA izolovaná z jehlic *Pinus sylvestris*, jejíž výsledek byl lepší. Přesto však štěpení neproběhlo, fragmenty byly purifikovány z gelu, namnoženy pomocí PCR a použity pro sekvenování.

**Sekvenování** nukleových kyselin je poměrně novou metodou – do poloviny 70. let byly analyzovány sekvence pouze velmi krátkých fragmentů DNA (15-20bp). Průlomovým momentem se stal rok 1977, kdy byly Allanem Maxamem a Walterem Gilbertem (Maxam a Gilbert 1977) a Frederickem Sangerem (Sanger et al., 1977) nezávisle publikovány dvě odlišné metody sekvencování, které umožnily analýzu delších úseků DNA. Dalším pokrokem bylo zavedení automatických sekvenátorů, které znamenalo podstatné zjednodušení a časovou úsporu metody a tím i rozšíření možností jak co do počtu zkoumaných taxonů, tak i množství analyzovaných sekvencí DNA. Díky těmto inovacím je sekvencování nukleových kyselin stále více rozšířeno i v ekologických a zoologických oborech.

Výsledky sekvenování byly porovnány se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank. Po provedení PCR reakce byly při použití primerů GYM získány jednotlivé pruhy o velikosti cca 300 bp (na gelu byl zřetelný 1 pruh o této velikosti). Po sekvenační analýze a porovnání získaných výsledků s databází GeneBank byly tyto produkty amplifikace identifikovány jako ITS oblasti z rodu *Pinus*. Naopak po provedení PCR reakce s univerzálními primery ITS1-ITS4 bylo získáno více amplifikačních produktů (2-5) a po provedení sekvenační analýzy byly tyto produkty identifikovány jako ITS oblasti různých druhů fytopatogenních a endofytních hub.

Při **SSR** analýze bylo celkem analýze podrobena 30 jedinců ze šesti evropských lokalit. Z dendrogramu zkonstruovaného z dat získaných analýzou všech šesti SSR primerů pomocí metody UPGMA je patrné, že rakouská populace *P. sylvestris* (18) vykazuje největší genetickou vzdálenost s polskou populací *Pinus rotundata* (14). Dále je patrné, že míra vnitropopulační variability je velmi vysoká a překračuje úroveň mezipopulační variability – dochází k „prolínání“ populací a vzorky z jedné populace jsou

zařazeny do různých clusterů. Tyto výsledky ukazují na vysokou míru variability ve sledovaných populacích.

## **6. ZÁVĚR**

V této diplomové práci jsem měla za úkol posoudit vhodnost technik molekulárních markerů separovaných elektroforetickou technikou pro účely hodnocení vnitropopulační a mezipopulační genetické variability v rámci agregátu *Pinus mugo*. Cílem práce nebylo provést populačně genetickou studii tohoto agregátu, ale zjistit, zda jsou techniky molekulárních markerů vůbec použitelné a jestliže ano, které z těchto technik vykazují nejvyšší variabilitu.

Z velkého počtu druhů rodu *Pinus* je patrné, že tyto druhy jsou velmi variabilní. Tato variabilita může souviset s jejich vysokou plastičností (schopností měnit svůj fenotyp v závislosti na změně podmínek prostředí).

Rozdíly mezi jednotlivými druhy a mezi jedinci v rámci populace jednoho druhu mohou být vyjádřeny fenotypickou variabilitou (rozdíly v morfologických znacích). Použitím molekulárních markerů bylo prokázáno, že diverzita druhů agregátu *Pinus mugo* může být silně podceněna, bude-li její hodnocení založeno jen na morfologických znacích.

Jako vhodný markerovací systém se jeví metoda mikrosatelitních markerů. Osvědčila se jako rychlá, jednoduchá a použitelná k identifikaci genotypů, pro porovnávání různých populací rostlin a ke studiu vnitropopulační a mezipopulační variability. Mikrosatelitní markery vykazovaly poměrně vysokou úroveň polymorfismu a mohly by být vhodným systémem pro hodnocení genetické variability v rámci dostupných genových zdrojů. Vhodnou metodou je i PCR-RFLP, která však pro reakci vyžaduje velice čistou templátovou DNA, je proto třeba k její izolaci používat naprosto čistý vzorek analyzovaného jedince, který vyloučí kontaminaci jiným organismem.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (1998):** Základy buněčné biologie. Espero publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, s.191-194, 315-320, 332-334.
- ANDREWS A.T. (1993):** Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications.- Oxford University Press, New York.
- BACHMANN K. (1992):** Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. Acta Botanica Neerlandica 39: 369-384
- BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W. (1980):** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism.- Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
- BUCCI G. a MENOZZI P. (1993):** Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. Mol. Ecol. 2: 227–232.
- BUSINSKÝ R. (1998):** Agregát *Pinus mugo* v bývalém Československu – taxonomie, rozšíření, hybridní populace a ohrožení. Zprávy České Botanické Společnosti, Praha, 33: 29-52.
- BUSINSKÝ R. (1999):** Taxonomická studie agregátu *Pinus mugo* a jeho hybridních populací. - ACTA PRUHONICIANA 68: 127-128.
- CAETANO-ANNOLÉS G. et al.(1991):** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology 9: 553-557.
- CARLSON J. E., TULSIERAM L. K., GLAUBITZ J. C., LUK V. W. K., KAUFFELDT C. a RUTLEDGE R. (1991):** Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. Theor. Appl. Genet 83: 194–200.
- ČURN V. a SÁKOVÁ L. (1996):** Speciální genetika rostlin – JU ZF, České Budějovice, s.73-74.
- ČURN V. a SÁKOVÁ L. (1997):** Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. – Genet. A Šlecht. 33: 281-305.
- ČURN V. (1998):** Analýzy biochemických a molekulárních markerů u kulturních a planých rostlin. – Habilitační práce. – JU ZF, České Budějovice.
- ERDELSKÝ K. a FRIČ F. (1979):** Praktikum a analytické metody vo fyziológii rastlín.- SPN, Bratislava.

- GERNANDT D.S., LISTON A., PIÑERO D. (2001):** Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* Subsection *Cembroides*: Implications for Molecular Systematic Studies of *Pine* Species Complex. –Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol.21, No. 3, December, pp.499-467.
- GRAMAN J.a kol., ČERNÝ J. a kol., HOUBA M., BERAN J. (1999):** Semenářství – JU ZF, České Budějovice.
- GROSBURG R. K., LEVITAN D. R., CAMERON B. B. (1996):** Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random Primer for the Novice and Nervous. Chapter 4 in: Molecular zoology. Advances, strategies and protocols. Editors Ferraris J.D., Palumbi S.R.. Wiley-Liss, Inc., USA.
- HARRIS D. J. a CRANDALL K. A. (2000):** Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes: Implications for phylogenetic and microsatellite studies. Mol. Biol. 17: 284-291.
- HARRISON R. G. (1993):** Hybrid Zones And The Evolutionary Process.- Oxford University Press, New York.
- HAMRICK J. L. (1990):** Isozymes and the Analysis of genetic structure in plant populations. – in: SOLTIS D. E., SOLTIS P. S. (EDS.): Isozymes in plant biology. – Chapman and Hall, London: 86-105.
- HOLUBIČKOVÁ B. (1965):** A study of the *Pinus mugo* complex (Variability and diagnostic value of characters in some Bohemian populations). Preslia 37: 276–288.
- HOŘEJŠÍ V. (1985):** Moderní elektroforetické metody. Český výbor společnosti průmyslové chemie, Ústřední odborná skupina biochemie, Pobočka ústavu molekulární genetiky ČSAV, Praha.
- HOEFER (1994):** Protein electrophoresis Application Guide.- HOEFER Scientific Instruments, San Francisco, CA.
- CHLOUPEK O. (2000):** Genetická diverzita, šlechtění s semenářství.
- CHRISTENSEN K.I. (1987):** A morphometric study of the *Pinus mugo* complex and its natural hybridization with *P. sylvestris* L. (Pinaceae).- Feddes Repertorium 98 11-12: 623-635.
- CHRISTENSEN K.I. (1987):** Taxonomic revision of the *Pinus mugo* complex and *P. × rhaetica* (*P. mugo* × *sylvestris*) (Pinaceae). Nordic Journal of Botany 7: 383–408.

- CHRISTENSEN K.I. a DAR G.H. (2003):** A morphometric study of hybridization between *Pinus mugo* and *P. sylvestris* (Pinaceae). *Acta Horticulturae* 615: 211–221.
- KNOBLOCH I.W. (1972):** Intergenetic hybridization in flowering plants.- *Taxon* 21: 97-103 [non vidi]
- KOBLÍŽEK J. (1996):** Systematická botanika lesnická. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno.
- LIU Z., BIYSHEV R. M., SAGHAI MAROOF M. A. (1996):** Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 869–876.
- LU M.-Z., SZMIDT A. E. a WANG X.-R. (1995):** Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). *Heredity* 74: 582–589.
- MULLIS B. (1987):** U.S. patent 4, 683, 195, July 1987 and U.S. patent 4, 683, 202, July 1987.
- NELSON C. D., KUBISIAK T. L., STINE M. a NANCE W. L. (1994):** A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill) based on random amplified polymorphic DNAs. *Heredity* 85: 433–439.
- O'DONNELL K. a CIGELNIK E. (1997):** Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.
- ONDŘEJ M. a DROBNÍK J. (2002):** Transgenozie rostlin, Academia, Praha.
- OVESNÁ J., RULCOVÁ J., POLÁKOVÁ K., KUČERA I., LEIŠOVÁ L. (2002):** DNA markéry – současnost a perspektivy. Sborník přednášek česko-slovenského workshopu “Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání genových zdrojů rostlin”: 85-93.
- PERKIN ELMER (1995):** AFLP<sup>TM</sup> Plant mapping kit protokol (P/N 402083).
- PERKIN ELMER (1996):** AFLP<sup>TM</sup> Plant mapping kit. Reklamní materiál firmy PERKIN ELMER.
- TAUTZ D. (1989):** Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471.
- TURŇA J. a kolektiv (1992):** Návody na cvičenia z génových manipulácií. – Univerzita Komenského, Bratislava.

- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. (1985):** Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SAIKI R.K., GEFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBOOK J. a RUSSEL D.W. (2001):** Molecular cloning. A laboratory manual.-CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SHAW G. R. (1914):** The Genus *Pinus*. *Publs. Arnold Arboretum*, No. 5., Cambridge, Massachusetts.
- SKALICKÝ V. (1982):** *Pinus mugo* agg. v SSR. Zpráva ze semináře o kleči a bříze v Jizerských horách 1982. 3 pp.
- STASZKIEWICZ J., TYSZKIEWICZ M. (1972):** Zmienność naturalnych mieszańców *Pinus sylvestris* L.  $\times$  *P. mugo* Turra (= *P. mugo*  $\times$  *rotundata* Link.) w południowozachodniej Polsce oraz na wybranych stanowiskach Czech i Moraw. – *Fragm. Florist. et Geobot.* 18: 173-191,
- SVOBODA P. (1953):** Lesní dřeviny a jejich porosty. Část I., SZN Praha.
- ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J. (2005):** Metody molekulární biologie, Masarykova univerzita v Brně, Brno, s.59-62,73-76
- SZMIDT A. E., WANG X.-R. a LU M.-Z. (1996):** Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76 : 412–420.
- RACLAVSKÝ V. (1998):** Úvod do základních metod molekulární genetiky.- Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- REHDER A. (1940):** Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America. New York. 996 p.
- ŘEPKOVÁ J., RELICHOVÁ J. (2001):** Genetika rostlin. Masarykova univerzita v Brně, Brno, s. 296 .
- RICHARDSON D.M. (1998):** Ecology and Biogeography of *Pinus*. – Cambridge university press, Cambridge.

- VOET D. a VOETOVÁ J.G. (1995):** Biochemie. – Academia, Praha.
- VON TUBEUF F. (1912):** Die Wuchsformen der Bergkiefer, *Pinus montana*.  
Mitteilungen der Deutschen Dendrologischen Gesellschaft 1912: 141–148.
- WACHOWIAK W., LEWANDOWSKI A. a PRUS-GLOWACKI W. (2005):**  
Reciprocal controlled crosses between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* verified by a species-specific cpDNA marker. *Journal of Applied Genetics* 46: 41–43.
- WILLIAMS J.G.K. a kolektiv (1990):** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- WEEDEN N.F. a WENDEN J.F. (1990):** Genetics of Plant Isozymes. – In: SOLTIS D.E. a SOLTIS P.S. (ed): *Isozymes in Plant Biology*. – Chapman and Hall, London, s.46-47.
- ZABEAU M., VOS P. (1993):** Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting.- EPO Patent No. 0534858A1.
- ŽUROVEC a kol. (1999):** Soubor materiálů k předmětu metody molekulární biologie.- Entomologický ústav AV ČR, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, s.126.

<http://www.conifers.org/pi>



## 8. PŘÍLOHY



Obr.1. a 2.: *Pinus mugo*







Obr.3.: *Pinus mugo* Turra



Obr.4.: *Pinus mugo* Turra



Obr.5.: Šišťice *Pinus mugo*



Obr.5.: Květenství *P. mugo*





Obr.6.: Šišťice *Pinus sylvestris*



Obr.7.: Květenství *Pinus sylvestris*



Obr.8.: Šišťice *Pinus nigra*



Obr.9.: Květenství *Pinus nigra*



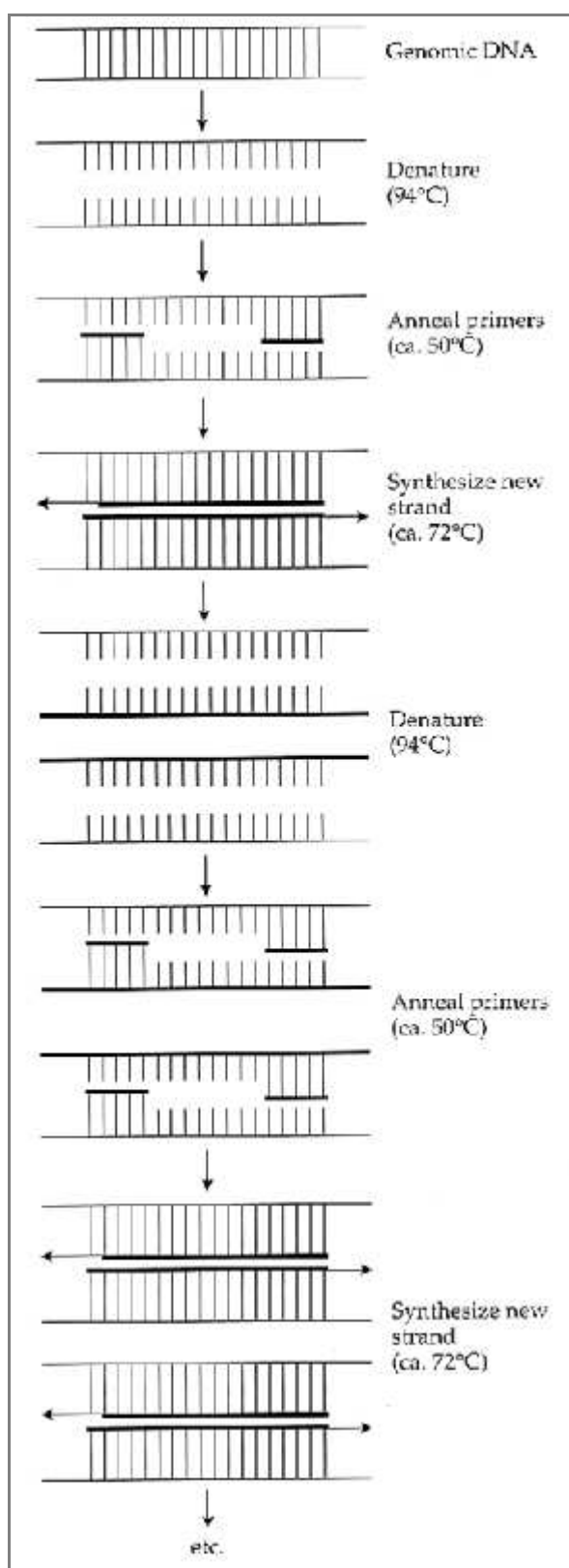
Obr.10.: Šišťice *Pinus uncinata*



Obr.11.: Květenství *Pinus uncinata*



Obr.11.: *Pinus rotundata*



**Obr. 1.: Mikrosatelitní markery- schéma průběhu reakce**



