

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Diplomová práce**

Veronika Nývltová

Olomouc 2012



Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká Fakulta  
Katedra Botaniky

Charakteristika molekulárních markerů pro studium *Salix*  
*phylicifolia* agg.

Diplomová práce

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika

Forma studia: prezenční

Autor: **Veronika Nývltová**

Vedoucí práce: **RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.**

Konzultant: **RNDr. Martin Dančák, Ph.D.**

Olomouc 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Radima J. Vašuta Ph.D. a uvedla veškeré literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Olomouci 30.7. 2012

Podpis:

### Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školitelovi Radimovi J. Vašutovi za vedení práce, jeho trpělivost a cenné připomínky. Děkuji také Milanovi Kitnerovi, který mi vždy ochotně poradil a pomáhal při laboratorních „útrapách“ a také Michalu Hronešovi za sběr vzorků pro laboratorní zpracování. Velký dík patří i mojí rodině, která mě ve studiu ohromně podporuje. Dále musím poděkovat také svým spolužačkám za skvělou atmosféru, která nás provázela po celé studium.

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Veronika Nývltová

**Název práce:** Charakteristika molekulárních markerů pro studium *Salix phylicifolia* agg.

**Typ práce:** diplomová práce

**Pracoviště:** Katedra botaniky PřF UP, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc

**Vedoucí práce:** RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

**Rok obhajoby:** 2012

**Abstrakt:** Skupina vrby bobkolisté patří v rámci rodu *Salix* k taxonomicky nejobtížnějším. V Evropě jsou z tohoto komplexu zastoupeny nominální typ vrba bobkolistá s širokým rozšířením na severu a severovýchodě Evropy, vrba dvoubarvá vyskytující se v Krkonoších, v Harzu a ve Vogézách, vrba Hegetschweilerova rostoucí v Alpách a *Salix hibernica*, která je endemitem Severního Irsku. Nejasné postavení má taxon *Salix basaltica*, který je v současnosti slučován s vrbou dvoubarvou. V minulosti způsobily řadu omylů v nomenklatorice vrby dvoubarvé záměny s podobnou vrbou Schraderovou, která se však vyskytuje pouze v kultuře. Pro studium okruhu vrby bobkolisté bylo testováno celkem 12 mikrosatelitních markerů. U 6 z nich se podařilo nalézt vhodné podmínky a tyto byly použity pro zhodnocení genetické variability populací vrby dvoubarvé v Krkonoších. Podle isoenzymových analýz, které byly v minulosti prováděny, se zjistilo, že populaci tvoří jediný klon. To se následně potvrdilo také v této studii s pomocí mikrosatelitů. Všechny rostliny měly stejný genotyp. Podobná situace byla prokázána rovněž u německých populací v Harzu, kde jsou také všichni jedinci se shodným genotypem. Jako srovnávací materiál bylo pro genetickou analýzu použito i několik vzorků vrby bobkolisté. 4 pocházely ze Švýcarska a 2 z Tater. U nich se ale prozatím nepodařilo identifikovat jednotlivé alely a určit genotypy. To bude předmětem dalšího studia.

**Klíčová slova:** skupina vrby bobkolisté, vrba dvoubarvá, *Salix*, molekulární markery, mikrosatelity

**Počet stran:** 52

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** český

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Veronika Nývltová

**Title:** Characterisation of molecular markers for *Salix phylicifolia* agg.

**Type of thesis:** Master's thesis

**Department:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University,  
Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc

**Supervisor:** RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

**The year of presentation:** 2012

**Abstract:** The tea-leaved willow group is one of most difficult groups within the genus *Salix* in Europe. This species complex consists of the nominate type *Salix phylicifolia*, which is widely distributed in northern and northeastern Europe, *Salix bicolor* occurring in Krkonoše mountains, Harz and Vosges, *Salix hegetschweileri* growing in Alps and *Salix hibernica* that is endemic to Northern Ireland. An assessment of *Salix basaltica* is still tricky. Nowadays, it is considered to be conspecific with *Salix bicolor*. Mistakes were caused further complexity; taxon *Salix schraderiana* that is similar to *Salix bicolor* but known from the culture only. *Salix phylicifolia* group were tested. Out of total of 12 tested primers, six ones were successfully optimised for studying genetic variability of *Salix bicolor* population in Krkonoše Mts. Isoenzyme analysis done in the past revealed that this population consist of the single clone. This phenomenon was preliminarily confirmed also study using of microsatellites. All available individuals in this study have the same genotype. Similarly populations in Harz, Germany consist of single genotype too. For genetic analysis we also used several tea-leaved willow individuals for comparison. Four of them originated from the Swiss Alps and two from Tatra Mts. Up to now genetic identification of these individuals was not successful. The future work should focus on optimising the microsatellites for all the species within the *S. phylicifolia* agg.

**Keywords:** Tea-leaved willow group, *Salix bicolor*, *Salix*, molecular markers, microsatellites

**Number of pages:** 52

**Number of appendices:** 0

**Language:** czech

## Obsah

Obsah .....	8
Seznam obrázků .....	9
Seznam tabulek .....	10
1 ÚVOD .....	11
1.1. Čeleď <i>Salicaceae</i> a rod <i>Salix</i> .....	11
1.2. Vliv čtvrtohorního zalednění a dalších faktorů na rozšíření a populační strukturu vrb .....	14
1.3. Charakteristika zástupců okruhu <i>Salix phylicifolia</i> .....	16
2 MOLEKULÁRNÍ MARKERY .....	20
2.1. Kodominantní markery .....	22
2.1.1. Alozymy .....	22
2.1.2. RFLP .....	22
2.1.3. SNPs .....	23
2.1.4. Mikrosatelity .....	24
2.2. Dominantní markery .....	25
2.2.1. RAPD .....	25
2.2.2. AFLP .....	26
3 CÍLE PRÁCE .....	27
4 MATERIÁL A METODY .....	28
4.1. Rostlinný materiál .....	28
4.2. Izolace genomické DNA .....	28
4.3. PCR reakce .....	29
4.4. Fragmentová analýza na polyakrylamidovém gelu .....	30
5 VÝSLEDKY .....	31
5.1. Izolace genomické DNA .....	32
5.2. Testování a charakterizování mikrosatelitů .....	33
6 DISKUZE .....	41
6.1. Izolace genomické DNA .....	41
6.2. Testování mikrosatelitů .....	41
7 ZÁVĚR .....	46
8 POUŽITÁ LITERATURA .....	47



## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1: Rozšíření taxonů z okruhu vrby bobkolisté v Evropě. Černé body znázorňují rozšíření <i>Salix phylicifolia</i>, červeně je vyznačen výskyt <i>S. bicolor</i>, modře <i>S. hegetschweileri</i>, oranžově <i>S. basaltica</i> a zeleně <i>S. hibernica</i> (upraveno podle Jalas &amp; Suominen 1972).</b> .....	17
<b>Obrázek 2: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx8.</b> .....	35
<b>Obrázek 3: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx10.</b> .....	36
<b>Obrázek 4: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx12.</b> .....	37
<b>Obrázek 5: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx14.</b> .....	38
<b>Obrázek 6: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx18.</b> .....	39
<b>Obrázek 7: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx23.</b> .....	40

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1: Přehled rozšíření a morfologických znaků mezi evropskými taxony skupiny <i>Salix phylicifolia</i> agg. (upraveno podle Rechinger 1964, Chmelař &amp; Koblížek 1990 a Newsholme 1992).</b> .....	19
<b>Tabulka 2: Koncentrace extrahované DNA jednotlivých vzorků.</b> .....	32
<b>Tabulka 3: Použité mikrosatelitní primery, podle Barker et al. 2003.</b> U mikrosatelitů, pro které se podařilo optimalizovat podmínky, je uvedena annealingová teplota ( $T_a$ ) a počet opakovaných cyklů (C) během PCR. ....	34
<b>Tabulka 4: Oskórované alely přítomné ve vzorcích pro jednotlivé mikrosatelity.</b> .....	35

# 1 ÚVOD

Vrby představují druhově velmi bohatý rod, který je zastoupen téměř po celém světě. Jedná se o ekonomicky poměrně významné dřeviny se širokým uplatněním např. v lesnictví, biotechnologii, zemědělství či v okrasném sadovnictví. Některé druhy vrb tvoří i nezanedbatelnou složku význačných rostlinných společenstev, mezi nimiž se vyskytuje také celá řada vzácných druhů v nejrůznějších stupních ohrožení. Pro svoji taxonomickou obtížnost jsou vděčným objektem nejrůznějších studií. V současnosti je díky využití molekulárních metod možné biosystematiku vrb podchytit na pevnějších exaktních základech.

Tato diplomová práce se zabývá zástupci vrb z širšího okruhu vrby bobkolisté (*Salix phylicifolia* agg.) a navazuje na předchozí bakalářskou práci, která podávala základní přehled o problematice v tomto okruhu. Měla také za úkol ověřit historické rozšíření vrby dvoubarevné na území ČR a zhodnotit stav jejích populací v Krkonoších, jakožto jediného zástupce této skupiny u nás. V diplomové práci byly testovány mikrosatelitní markery pro pozdější studium genetické variability vybraných taxonů tohoto okruhu.

## 1.1. Čeleď *Salicaceae* a rod *Salix*

Čeleď vrbovité (*Salicaceae* Mirbel), náležející do řádu *Malpighiales* Martius (Chase et al. 2002), má rozšíření po celém světě (Stevens 2001) s těžištěm výskytu v temperátní zóně severní polokoule (Penhallow 1905). Na základě studia *rbcL* genů je sesterskou skupinou k čeledi *Salicaceae* tropická čeleď *Flacourtiaceae*. V závislosti na různém pojetí se v rámci vrbovitých vyčleňují 2-4 rody, z nichž nejpočetnějším je rod vrba (*Salix* L.). Kromě toho čeleď zahrnuje také rod topol (*Populus* L.). Značně nejednotný názor panuje na postavení dalších dvou východoasijských rodů *Chosenia* Nakai a *Toisusu* Kimura, vyznačujících se některými primitivními znaky (Azuma et al. 2000). Ovšem podle molekulárních analýz chloroplastového genu *rbcL*, *trnD-T* a *atpB-rbcL* mezerníků se tyto „primitivní“ znaky vyvinuly až sekundárně a oba rody jsou nyní začleňovány do rodu *Salix* (Chen et al. 2010).

Vrbovité jsou dvoudomé dřeviny s keřovitým i stromovitým vzrůstem a měkkým dřevem. Listy jsou jednoduché, střídavé nebo vzácně vstřícné. Jehnědovité květenství nese množství silně redukovaných, jednopohlavných, bezobalných květů. Plodem je

tobolka otevírající se 2-4 chlopněmi. Semena postrádající endosperm mají při bázi svazeček chlupů a vyznačují se rychlým klíčením (Chmelař & Koblížek 1990).

Zdaleka nejvíce druhů je zastoupeno v rodě vrba, který jich podle různých autorů čítá několik set. Chmelař (1985) uvádí 250-300 druhů, Hörandl et al. (2002) 400-500 druhů, Procházka et al. (1999) či Argus (1986) dokonce 300-600 druhů. Určit přesný počet je ovšem velice obtížné vzhledem k různým taxonomickým koncepcím, kdy v závislosti na pojetí zařazení některých taxonů kolísá od úrovně druhu po varietu. Rozšíření vrb je téměř celosvětové s výjimkou Oceánie, kam byly introdukovány až člověkem (Argus 1997), při čemž těžiště výskytu leží v mírném až subarktickém pásu severní polokoule (Procházka et al. 1999). Většina vrb má kontinentální charakter výskytu, pouze 2% nalezneme na ostrovech (Cejlón, Kanárské Ostrovy, Madeira, Filipíny, Madagaskar) (Penhallow 1905, Newsholme 1992). Centry diverzity jsou Čína s 275 druhy, území bývalého Sovětského Svazu s přibližně 120 druhy, Severní Amerika se 103 druhy a také Evropa, kde se vyskytuje 65 druhů vrb (Chen et al. 2010). Naopak vzácně je rod zastoupen v Jižní Americe a v tropické Africe (Newsholme 1992).

Vrby jsou velmi komplexní skupinou, jejíž taxonomie je od dob Linného stále revidována. Již tradiční dělení rodu, uznávané především v Evropě, na tři podrody a ty dále na sekce zavedl Skvortsov. Rozlišoval subgenus *Salix*, subgenus *Vetrix* Dumort. a subgenus *Chamaetia* (Dumort.) Nasarov. Naproti tomu Dorn, který se zabýval studiem amerických zástupců, rozlišoval podrody pouze dva a to subgen. *Salix* a subgen. *Vetrix*, kam začlenil i Skvortsovův podrod *Chamaetia* (Leskinen & Alström-Rapaport 1999). Značná nejednotnost v systematice vrb je mimo jiné připisována nedostatku informativních morfolgických znaků. Např. mnoho důležitých znaků, které se uplatňují při klasifikaci ostatních krytosemenných rostlin, se nachází na květech, které jsou ale v tomto případě silně redukovány. Pro taxonomii vrb je tedy nutné využívat jiné zdroje informací, kterými jsou v současné době hojně používané molekulární analýzy s využitím neutrálních molekulárních markerů (Azuma et al. 2000). Ať tak či tak, v každém případě jsou zástupci podrodu *Salix* pokládáni za vývojově primitivnější. Jedná se o tzv. pravé vrby se stromovitým vzrůstem či vysoké keře, které mají úzké a špičaté listy. Typickými příklady jsou vrba bílá (*S. alba* L.), vrba křehká (*S. euxina* Belyaeva, syn.: *S. fragilis* auct. non L.) či vrba pětimužná (*S. pentandra* L.), která je považována za vůbec jeden z nejstarobylejších druhů v rámci celého rodu. Naproti tomu

vrby ze zbývajících dvou podrodů se vyznačují odvozenějšími znaky. Podrod *Vetrix* zahrnuje většinou keře nebo malé stromy kvetoucí obvykle ještě před rašením listů, jejichž tvar je velmi rozmanitý. Typickými představiteli jsou např. vrba jíva (*S. caprea* L.), vrba ušatá (*S. aurita* L.), vrba popelavá (*S. cinerea* L.) nebo vrba bobkolistá (*S. phylicifolia*). Pro podrod *Chamaetia* je charakteristický zakrslý, plazivý vzrůst jakožto adaptace k drsným arktickým či subalpínským podmínkám. Typickými zástupci jsou vrba bylinná (*S. herbacea* L.), vrba síťnatá (*S. reticulata* L.) nebo vrba uťatá (*S. retusa* L.) (Newsholme 1992, Azuma et al. 2000).

Nejstarší fosilní záznamy vrb pocházejí z Ameriky a jsou datovány do období spodního eocénu, tedy před 55-65 miliony let. Jedná se o zástupce podrodu *Salix*. Zkameněliny odvozenějšího podrodu *Vetrix* byly datovány až z oligocénu (před 38-55 miliony let). Fosilní zbytky evropských vrb jsou z ještě pozdějších období (Leskinen & Alström-Rapaport 1999). Pravděpodobným vývojovým centrem vrb je oblast hor jihovýchodní Asie, kde se také vyskytují někteří fylogeneticky původnější zástupci společně s primitivními druhy topolů a rovněž rod *Chosenia* (Newsholme 1992). Za další centrum lze považovat tropickou a subtropickou Ameriku. Z těchto center se vrby postupně rozšiřovaly především do oblastí mírného pásu a dále na sever, do tropických a subtropických oblastí pouze minimálně. Další diference pak probíhala pravděpodobně v neogénu v Eurasii a v Severní Americe (Hörandl et al. 2002). Klimatické změny při střídání glaciálů s interglaciály ve čtvrtohorách měly za následek další změny areálů druhů, což zásadně ovlivnilo jejich současné rozšíření (Newsholme 1992).

Determinace vrb v terénu není mnohdy vůbec snadná. Komplikace při jejich určování způsobují některé jevy, které jsou pro ně příznačné. Jsou to zejména relativně vysoký stupeň hybridizace a introgrese, značná genetická a morfologická variabilita a již zmíněná redukce morfologických znaků na květech (Brunnsfeld et al. 1991).

Vysoká schopnost mezidruhového křížení je u vrb sice běžná, nicméně bývá často poněkud nadhodnocována (Chmelař & Koblížek 1990). Dosud bylo popsáno více než 200 mezidruhových hybridů. Ke křížení mezi druhy z jednotlivých podrodů však dochází velmi zřídka (Newsholme 1992). Argus (1997) poukazuje na vliv zejména antropogenních disturbancí na hybridizaci, kdy dochází k odstranění bariér, což následně vede k šíření a kontaktu mezi jedinci. To vysvětluje, proč je hybridizace tolik

výrazná v Evropě, jejíž území je člověkem značně ovlivňováno po staletí (Newsholme 1992). Argus (1997) tedy považuje hybridizaci některých skupin vrb za víceméně dočasný fenomén, kdy je mezidruhové křížení výsledkem příležitosti omezené prostorem i časem, a není dominantním procesem evoluce, ačkoliv hybridizace společně s polyploidii sehrály v evoluci vrb velkou roli (Argus 1986).

V rodu *Salix* nalezneme různé stupně ploidie a to jak v rámci jednoho druhu, tak i mezi různými druhy. Polyploidie se vyvinula několikrát nezávisle na sobě a je dokonce pravděpodobné, že se vyskytla i vícekrát v rámci stejného druhu (Leskinen & Alström-Rapaport 1999). Základním chromozómovým počtem u vrb je  $x=19$ . Většina našich zástupců jsou diploidi ( $2n=2x=38$ ) nebo tetraploidi ( $2n=4x=76$ ), nicméně jsou známy i druhy s ploidii až po  $2n=12x=228$ . U blízce příbuzných druhů jsou ale počty chromozómů většinou stejné (Chmelař 1979). Vzhledem k tomuto vysokému základnímu chromozómovému číslu je pravděpodobné, že u vrb proběhla dávná polyploidizace (Aravanopoulos et al. 1993). Paleopolyploidie už byla prokázána u sesterských topolů, které mají stejné základní chromozómové číslo a jsou stabilně diploidní (Sterck et al. 2005). Stevens (2001) uvádí, že genová duplikace u společného předka vrb a topolů proběhla v době před 60-65 miliony let.

## **1.2. Vliv čtvrtohorního zalednění a dalších faktorů na rozšíření a populační strukturu vrb**

Současné rozšíření druhů poskytuje užitečné informace pro porozumění jejich historie a faktorů, které formovaly vnitrodruhovou variabilitu (Argus 2007). V tomto ohledu jsou velmi zajímavými objekty studia genetických procesů v populacích reliktní druhy, jejichž výskyt je často velmi fragmentovaný díky dlouhodobé izolaci v minulosti (Reisch 2001). Rozšíření druhů tak, jak jej známe dnes, se zformovalo po posledním klimatickém cyklu, jehož maximum je datováno do doby před asi 18-22 tisíci let (Baker 2000). Série glaciálních cyklů během pleistocénu pokaždé ochudily tehdejší biotu ve většině částech Evropy. Areály druhů při zalednění fragmentovaly a populace přežívaly často jako zbytky v izolovaných refugiích (Baker 2000). Dlouhodobá izolace ovlivnila genetickou variabilitu takovýchto relativně malých populací, ve kterých se mohl uplatňovat genetický drift a fixovat nově vzniklé mutace (Freeland 2005). Škodlivé

mutace a účinky driftu se v malých populacích projevují mnohem výrazněji (Dudash & Fenster 2000). Přežívání druhů v refugích během glaciálu je považováno za hlavní evoluční proces způsobující diferenciaci a vznik oddělených linií (Tribsch & Schönswetter 2003). V postglaciálu se taxony šířily zpět z jižněji položených refugií, což mělo další vliv na jejich genetickou variabilitu. Kolonizátoři, kteří expandovali před hlavním migračním proudem rychleji, mohli zakládat nové kolonie, ovlivňované především *bottleneck* efektem, což vedlo k další ztrátě alel (Hewitt 1996, Beebee & Rowe 2004). Důležitou roli při šíření druhů v tomto období hrála topografie každého regionu. Jako významné bariéry se uplatňovala zejména evropská pohoří (Tribsch & Schönswetter 2003).

K zachování glaciální květeny během holocénu, zvláště při dalším pozdějším oteplení klimatu v období atlantiku, přispěly zejména kary, skalní stěny a srázy, prudké kamenité svahy, skalní štěrby a průrvy, ale i rašeliniště a další stanoviště primárního bezlesí, kam les z edafických příčin proniknout nemohl (Hendrych 1980).

Populační strukturu vrb dále ovlivňuje také způsob rozmnožování. Obvykle se u rostlin střídá sexuální rozmnožování s nepohlavním. Druhy s takto kombinovanými reprodukčními systémy využívají výhod obou dvou strategií. Pohlavní rozmnožování umožňuje adaptace na měnící se podmínky prostředí a kolonizaci nových biotopů, kdežto klonální reprodukce udržuje dobře adaptované genotypy (Reisch et al. 2007). U vrb se tento typ rozmnožování vyskytuje velmi často, zejména u vysokohorských druhů hraje důležitou roli (Pluess & Stöcklin 2004). Obecně se totiž předpokládá, že význam klonálního rozmnožování stoupá se zvyšující se nadmořskou výškou. Produkce semen se pro rostliny ve vysokohorských podmínkách stává riskantní a vegetativní reprodukce tak představuje způsob, jak se s tímto omezením lze vyrovnat (Reisch et al. 2007). Kromě toho se klonalita může uplatňovat při mezidruhové hybridizaci, kdy je vzniklé potomstvo částečně sterilní a díky klonálnímu rozmnožování hybridy mohou přežít do doby, než nastanou vhodné podmínky pro jejich sexuální reprodukci (Salick & Pfeffer 1999). Obecně lze říct, že populace klonálních rostlin vykazují značnou úroveň genetické variability (Pluess & Stöcklin 2004). Variabilitu si mohou udržovat vlivem nízké míry genetického toku anebo mutacemi (Ellstrand & Roose 1987).

Způsob rozmnožování je také významným kritériem pro výběr vhodného managementu ohrožených druhů. V případě, že u nich převažuje vegetativní šíření, lze použít výsadbu např. z řízkového materiálu. U druhů s převažujícím pohlavním rozmnožováním je

nutné zajistit celou řadu faktorů potřebných k tomu, aby bylo zajištěno úspěšné kvetení, produkce semen a růst semenáčků (Stamati et al. 2007).

### 1.3. Charakteristika zástupců okruhu *Salix phylicifolia*

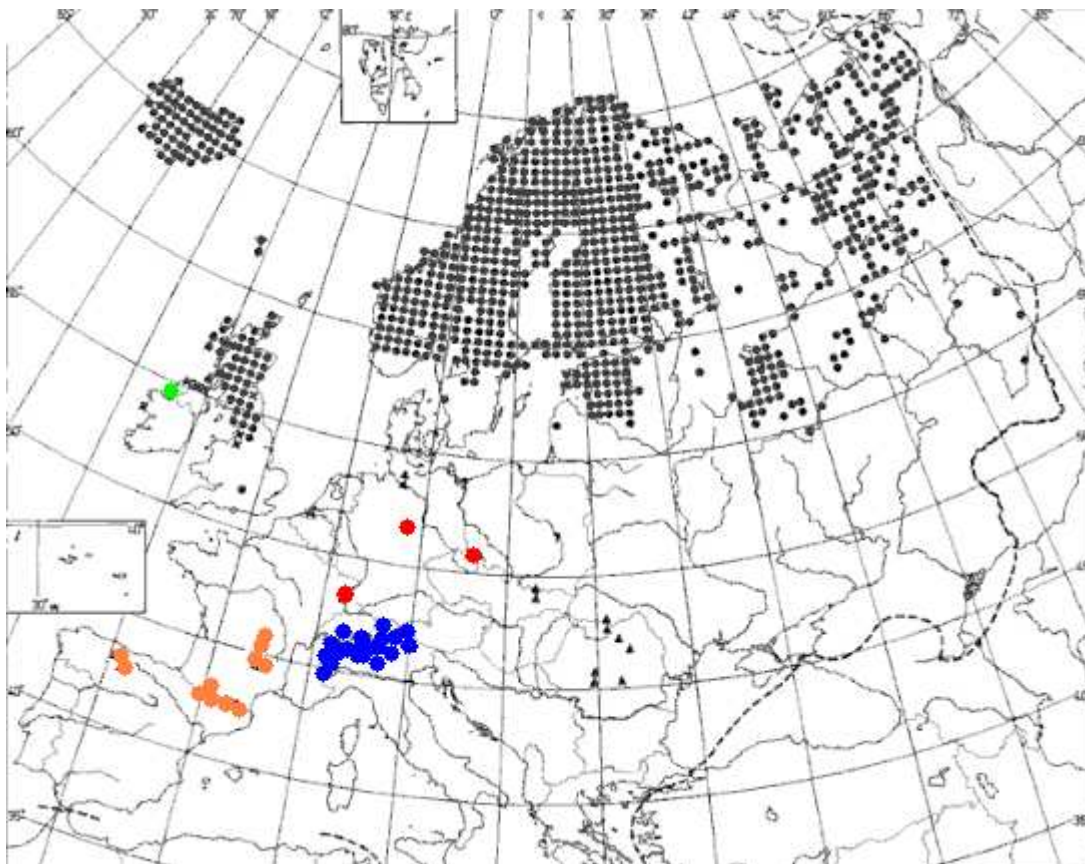
Druhy ze skupiny vrby bobkolisté patří do podrodu *Vetrix*. Skvortsov (1999) je dále řadí do sekce *Arbuscella*, zatímco Argus (1997) do vlastní sekce *Phylicifoliae*. Pro vrby této skupiny je charakteristický keřovitý vzrůst s výškou do 4 m. Listy jsou lysé, eliptické až kopinaté a na líci více či méně lesklé, na rubu nasivělé. Jehnědy jsou téměř přisedlé nebo jen krátce stopkaté, semeníky hedvábitě chlupaté (Rechinger 1964). Drobné odlišnosti mezi jednotlivými taxony nalezneme například ve tvaru listového okraje, ve zbarvení a tvaru pupenů a v některých dalších znacích (Suda & Argus 1968). Evolučně nejbližší k této sekci mají druhy ze sekcí *Villosae*, *Lanatae* a *Cinerella* (Argus 1997).

Okruh vrby bobkolisté zahrnuje několik blízkce příbuzných druhů s výskytem především na severu Evropy, Asie a Severní Ameriky (Chmelař 1972, Chmelař 1985). V Evropě jsou zastoupeny vrba bobkolistá (*Salix phylicifolia* L.), vrba dvoubarvá (*Salix bicolor* Willd.), vrba Hegetschweileroва (*Salix hegetschweileri* Heer.) a *Salix hibernica* Rech. f. (Chmelař 1985). Ze severní Ameriky uvádí Argus (1997) ještě *Salix pulchra* a *Salix planifolia*. Pro všechny druhy je shodný počet chromozómů  $2n=4x=76$  (Argus 1997), pouze u *Salix phylicifolia* se navíc uvádějí také hexaploidi s  $2n=6x=114$  (Rechinger 1964, Chmelař 1985).

Komplex vrby bobkolisté patří k taxonomicky nejobtížnějším v rámci rodu *Salix*. Komplikace činí zejména silná tendence k hybridizaci s vrbou černající a také s některými zástupci z okruhu *Salix glauca* a ze sekce *Capreae* (Rechinger 1964). Spoustu nomenklatorických nejasností kolem vrby bobkolisté v minulosti způsobily záměny s velmi proměnlivou vrbou černající. Nevyjasněné je také postavení taxonu *Salix basaltica* Coste, který roste v Pyrenejích a v současnosti je slučován s vrbou dvoubarvou. V Alpách se vyskytuje velmi podobná *Salix rhaetica* Bus. přiřazovaná k vrbě Hegetschweilerově. A především, jasné nejsou ani vztahy mezi jednotlivými populacemi vrby dvoubarvé v rámci střední Evropy (Chmelař 1972).



**Obrázek 1: Rozšíření taxonů z okruhu vrby bobkolisté v Evropě.** Černé body znázorňují rozšíření *Salix phylicifolia*, červeně je vyznačen výskyt *S. bicolor*, modře *S. hegetschweileri*, oranžově *S. basaltica* a zeleně *S. hibernica* (upraveno podle Jalas & Suominen 1972).



### ***Salix phylicifolia* L. - vrba bobkolistá**

**Popis:** Nižší keř vysoký 2-3 m. Letorosty jsou tmavě hnědě zbarvené. Lišty na dřevě oloupaných větví chybí. Pupeny jsou tmavě hnědé a zašpičatělé. Listy jsou vejčité až úzce eliptické, na líci jasně zelené a lesklé. Jehnědy mají válcovitý tvar a jsou buď přisedlé nebo na kratičké stopce. Semeníky jsou hustě chlupaté (Rechinger 1957, Newsholme 1992).

**Ekologie:** Roste v křovinách vyšších poloh, na kyselých podkladech (Chmelař 1972).

**Počet chromozómů:** Uváděny jsou jak tetraploidní ( $2n=76$ ), tak i hexaploidní rostliny ( $2n=114$ ) (Chmelař 1985).

**Rozšíření:** Souvislý areál druhu zahrnuje severní a severovýchodní Evropu (Chmelař 1972).

**Hybridizace:** Ke křížení dochází s druhy *Salix glauca*, s vrbou černající, vrbou ušatou a vrbou popelavou (Rechinger 1957).

***Salix bicolor* Willd. – vrba dvoubarvá**

**Popis:** Nižší až středně vysoký keř s výškou do 1,5 m. Letorosty mají žlutohnědou barvu. Na dřevě po sloupnutí kůry jsou krátké, ale zřetelné lišty. Pupeny jsou přítupé, vejčitého tvaru a žlutooranžově zbarvené. Tvar listu je eliptický, s téměř celokrajnou čepelí. Listy jsou na líci tmavě zelené, lesklé a na rubu sivozelené. Jehnědy jsou přisedlé, válcovité. Semeníky jsou porostlé lesklými hedvábitými chlupy (Rechinger 1957, Rechinger 1964, Chmelař 1985, Chmelař & Koblížek 1990).

**Ekologie:** Roste ve vlhkých subalpínských křovinách ve společenstvech svazu *Salicion silesiaca* (Kočí 2007). Je světlomilná a chladnomilná (Chmelař & Koblížek 1990).

**Počet chromozómů:** Tetraploidní druh s  $2n=76$  (Chmelař & Koblížek 1990).

**Rozšíření:** Endemit hor střední Evropy. Mimo Krkonoše se vyskytuje také v Harzu a ve Vogézách (Chmelař 1972).

**Hybridizace:** Z Krkonoš byl popsán kříženec s vrbou slezskou, *Salix ×paxii* Woloszczak (Chmelař & Koblížek 1990). V literatuře je ale uváděn i hybrid s vrbou laponskou (Šourek 1969, Procházka 1989). Rechinger (1957) z ostatních lokalit v Evropě navíc uvádí i hybridy s vrbou jívou a vrbou plazivou.

**Poznámka:** Vrba dvoubarvá je kriticky ohrožený druh a jako glaciální relikv představuje jedinečný doklad toho, jak se naše příroda vyvíjela v postglaciálu.

V minulosti způsobila mnohé nesrovnalosti v nomenklatuře vrby dvoubarvé vzhledově velmi podobná vrba Schraderova (*Salix schraderiana* Willd.). Ta se však v přírodě spontánně nevyskytuje a je známá pouze z kultury jako výhradně samčí kultivar. Její původ je neznámý, pravděpodobně se jedná o křížence vrby dvoubarvé s vrbou plazivou. Chybami v synonymice však došlo k přiřazení kulturních lokalit vrby Schraderovy (u Nových Hradů, povodí Sázavy, okolí Prahy) k přirozenému výskytu vrby dvoubarvé, která má u nás ale jen jedinou lokalitu v Obřím Dole v Krkonoších (Chmelař 1968).

Ostatní taxony ze skupiny vrby bobkolisté jsou si morfologicky velmi podobné. Hlavní rozlišovací znaky a jejich rozšíření shrnuje tabulka níže.

**Tabulka 1: Přehled rozšíření a morfologických znaků mezi evropskými taxony skupiny *Salix phylicifolia* agg.** (upraveno podle Rechinger 1964, Chmelař & Koblížek 1990 a Newsholme 1992).

	<i>S. phylicifolia</i>	<i>S. bicolor</i>	<i>S. hegetschweileri</i>	<i>S. hibernica</i>
<b>rozšíření</b>	Eurasie, severní Evropa	Vogézy, Harz, Krkonoše	Alpy	Severní Irsko
<b>větve</b>	tmavé	zelenavě žlutohnědé	kaštanové/tmavě hnědé	žlutozelené
<b>lišty</b>	-	krátké	-	-
<b>pupeny</b>	na vrcholu smáčklé, zašpicatělé, tmavě hnědé	vejčité/oblé, přítupé, žlutě oranžové	kaštanově hnědé	žluté

## 2 MOLEKULÁRNÍ MARKERY

V roce 1985 zavedl dr. Kary Mullis polymerázovou řetězcovou reakci (PCR, *polymerase chain reaction*). Tento fenomenální nápad umožnil vědcům izolovat a amplifikovat specifické úseky DNA z genomu. Principiálně je PCR založena na replikaci nukleových kyselin a její podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'-3'. Daný úsek DNA je vymezený pomocí dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě (Šmarda et al. 2005). Primery jsou obvykle velké 15-35 bp a jsou nezbytným startovacím místem pro syntézu DNA. Každý cyklus PCR reakce má tři kroky: denuraci DNA (94-96 °C), připojení primerů (annealing, obvykle mezi 40-65 °C), a prodlužování nově vznikajících řetězců (extension, obvykle 72 °C). Annealingová teplota umožňuje primerům správné nasednutí na komplementární místo na DNA řetězci. Při konečné fázi (tj. extenzi) se uplatňuje polymeráza a volné nukleotidy, které zajišťují prodlužování řetězců (Freeland 2005). V současné době se používá teplotně stabilní polymeráza, tzv. Taq polymeráza, izolovaná z bakterií *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech, která odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Reakce probíhají v opakujících se cyklech v přístrojích, které automaticky mění teplotu, v cyklerech. Počet kopií DNA vzniklých při PCR roste exponenciálně (např. miliarda kopií daného úseku vznikne za 32 cyklů). PCR podmínky pro jednotlivé primery je obvykle nutné optimalizovat úpravou počtu cyklů, annealingové teploty apod. Optimální počet cyklů závisí na koncentraci templátové DNA a nejčastěji se pohybuje v rozmezí 25-35 cyklů. Příliš vysoký počet cyklů zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů, které značně zkreslují výsledek. Annealingová teplota se pro různé primery značně liší, zpravidla se pohybuje mezi 30-65 °C (Šmarda et al. 2005). Konečné produkty PCR reakce jsou následně charakterizovány různými způsoby. Nejjednodušším způsobem, jak můžeme určit genetickou identitu jedinců z PCR produktů, je jejich elektroforetická separace na agarózovém či akrylamidovém gelu. Rychlost, jakou DNA fragmenty migrují v gelu, závisí především na jejich velikosti, přičemž větší fragmenty se pohybují pomaleji. Vizualizace fragmentů se provádí různými způsoby barvení, velikosti jednotlivých bandů jsou odečítány z tzv. ladderu, který se skládá z fragmentů o známých velikostech.

Velmi důležitým kritériem pro PCR reakci jsou sekvence jednotlivých primerů. Primery můžeme klasifikovat jako univerzální nebo druhově specifické, ačkoliv navzdory svému názvu žádný primer není zcela univerzální pro všechny druhy. Takovéto primery amplifikují stejné úseky DNA u různých druhů. To je možné díky tomu, že homologické sekvence u různých druhů často vykazují určitý stupeň podobnosti, protože jsou odvozeny ze stejného předkovského genu. Univerzální primery jsou oblíbené v případech takových organismů, pro které žádné specifické sekvence dosud neexistují. Naproti tomu druhově specifické primery amplifikují cílové sekvence pouze u vybraného druhu, případně několika blízkce příbuzných druhů. Přestože počáteční vývoj těchto primerů je složitější než u univerzálních, druhově specifické primery snižují pravděpodobnost amplifikování nežádoucí DNA (kontaminace). Navzdory případným problémům s kontaminací je PCR obecně robustní technikou používanou v různých odvětvích molekulární biologie. Metody založené na PCR reakci jsou velmi užitečné při záchranných programech, kdy je potřebné získat data při zachování velikosti populace ohrožených druhů. Z praktického hlediska je také výhodné to, že vzorky pro PCR nasbírané v terénu lze velmi snadno skladovat, na rozdíl od např. enzymových analýz, kdy se musí umístit do tekutého dusíku nebo na led. Problém však může nastat, pokud DNA není extrahována z čerstvého materiálu. Taková DNA je již částečně degradovaná a fragmentovaná. Pokud jsou fragmenty kratší než požadované úseky, amplifikace nebude možná a mohou tedy být připojeny relativně krátké sekvence (Freeland 2005).

Výběr vhodných molekulárních markerů závisí na několika faktorech. V první řadě záleží na tom, jaký stupeň variability očekáváme. Některé úseky genomu mají rychlejší evoluci než jiné. Obecně markery, které nám umožní rozlišit dva blízkce příbuzné organismy, musejí být vysoce variabilní, zatímco vztahy mezi vzdáleně příbuznými taxony mohou být objasňovány pomocí méně variabilních markerů. Na výběr markerů můžeme pohlížet také z praktického hlediska, kdy se rozlišují dvě hlavní kategorie: dominantní a kodominantní. Kodominantní markery jsou takové, s kterými můžeme identifikovat všechny přítomné alely v určitém lokusu. Dominantní markery mohou odhalit pouze jednu dominantní alelu. Lze tedy říci, že použití kodominantních markerů je preciznější, ačkoliv vývoj dominantních markerů vyžaduje méně času a za některých podmínek mohou být k získání dat výhodnější.

## 2.1. Kodominantní markery

U diploidních organismů odhalí každý dominantní marker jednu alelu u homozygotů a dvě alely u heterozygotů. Tato schopnost rozlišovat mezi homozygoty a heterozygoty je jedním z nejdůležitějších rysů kodominantních markerů, protože tak můžeme snadno spočítat frekvence alel ve směsných vzorcích (jako jsou populace). Výhodou tedy je, že tyto markery mohou charakterizovat jediný lokus. Hlavní nevýhodou těchto markerů je jejich relativní časová náročnost a relativně vysoká cena, což může limitovat počet genotypovaných lokusů.

### 2.1.1. Alozymy

Alozymy představují jedny z vůbec prvních markerů, vzniklých v 60. letech. Přestože se stále hojně používají v různých studiích, v současné době se uplatňují méně často než DNA markery. Jejich výhodou je, že jsou méně časově náročné a relativně levné než ostatní markery. Nevýhodou ovšem je, že jejich variabilita závisí na nesynonymních substitucích v genech kódujících proteiny, což je limitující při detekci genetické variability. Jinak řečeno, alozymové markery mohou podhodnocovat skutečnou genetickou variabilitu a nemusejí být vždy reprezentativní pro celý genom (Reisch 2001). Navíc alozymy mají omezené využití ve studiích zabývajících se evolučními vztahy mezi různými alelami – není vždy možné zjistit předka a jeho potomka. Alozymy jsou funkční proteiny a nemohou tedy být vždy selektivně neutrální, což je současně jak výhoda tak i nevýhoda. Nedostatek neutrality se jeví nevýhodně pokud je marker použit k testování toho, jak jsou od sebe populace vzájemně geneticky odlišné. Na druhou stranu pokud použijeme markery, které nejsou neutrální, lze s nimi najít důkazy o adaptivních znacích. Alozymy podléhají selekčním tlakům, kdežto DNA markery jsou pravděpodobně neutrální (Pénzes et al. 2002), ačkoliv je vždy možné, že zjevně nefunkční úseky DNA jsou pod vlivem selekčních tlaků a tyto jsou připojeny k úsekům funkčním. Tento jev se byl popsán jako *hitch-hiking effect* (Freeland 2005).

### 2.1.2. RFLP

RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) byly prvními široce používanými DNA markery. RFLP data jsou generována pomocí restričních enzymů, které

„nastříhají“ DNA na krátké specifické sekvence (obvykle o velikosti 4-6 bp). Pokud mají dva jedinci různé vzdálenosti mezi dvěma restrikčními místy, budou se výsledné fragmenty lišit svojí délkou. RFLP tedy nezkoumá celé sekvence DNA, ale každá mutace, která vede ke ztrátě nebo k vytvoření rozpoznávacích míst pro restrikční endonukleázy, nebo změna v délce sekvencí mezi dvěma restrikčními místy, se projeví ve velikosti a počtu fragmentů (Šmarda et al. 2005). RFLP analýza může být prováděna jak na celém genomu, tak i na specifických fragmentech DNA. Tradičně zahrnuje rozštěpení DNA pomocí restrikčních enzymů a rozdíly ve velikosti vzniklých fragmentů pak lze snadno detekovat gelovou elektroforézou. Restrikční fragmenty jsou poté přeneseny na membránu, kde hybridizují se značenými sondami specifickými pro polymorfni oblasti genomu (tzv. *Southern blotting*). Selektivní hybridizace umožní snadnější interpretaci výsledků analýzy snížením počtu srovnávaných fragmentů. Tato metoda je vhodná pro studium relativně velkých množství DNA, nicméně je poměrně náročná na provedení a čas.

Mnohem přímější metodou, jak získat RFLP data, je nejdříve amplifikovat specifické fragmenty pomocí PCR a tyto amplifikované produkty nastříhat restrikčními enzymy. Fragmenty jsou následně vizualizovány na gelu. Tato metoda se nazývá PCR-RFLP (Freeland 2005).

### 2.1.3. SNPs

SNPs (*single nucleotide polymorphism*) jsou poměrně novou metodou, která si získává na oblibě, protože závisí na pozici jediného páru bazí v sekvenci DNA, kterým se od sebe jedinci liší. Mnoho SNPs má pouze dva stavy, tzn. každý jedinec má 1 ze 2 možných nukleotidů v daném SNP lokusu. Jedná se tedy o bialelické markery (Sucher 2012). SNPs mohou být identifikovány relativně přímočaře sekvenováním PCR produktů, které byly amplifikovány pomocí univerzálních či druhově specifických primerů, nebo sekvenováním anonymních lokusů. Míra mutací SNPs je v průměru  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$ , což je méně než např. u mikrosatelitů (viz dále) a tedy nejslibnější aplikací SNPs. Tento typ markerů lze použít jak k hodnocení variability jedinců tak i populací (Šmarda et al. 2005, Freeland 2005).

#### 2.1.4. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou známé jako SSRs (*simple sequence repeats*) nebo STRs (*short tandem repeats*). Jedná se o úseky DNA, které se skládají z tandemových repetací o velikosti 1-6 bp. Mikrosatelity se nacházejí napříč celým genomem jádra i chloroplastů, ale byly nalezeny i v mitochondriích některých druhů. Počáteční vývoj mikrosatelitů je časově a finančně náročný. Pokud jsou primery již navrženy, můžeme s jejich pomocí získávat data k amplifikaci mikrosatelitních alel PCR reakcí velmi rychle. Produkty mohou být poté separovány na gelech s vysokou rozlišovací schopností, kde zjistíme velikost každé alely. Počet druhů, pro které byly mikrosatelity popsány, stoupá velmi rychle a sekvence, které jsou připojeny na mikrosatelitní lokusy, jsou často zakonzervovány mezi blízce příbuznými druhy, což znamená, že mikrosatelitní primery mohou být využity k získávání dat z mnoha druhů (Pénzes et al. 2002). Mikrosatelity mají vysokou mutační rychlost na rozdíl od většiny ostatních typů sekvencí ( $10^{-4} - 10^{-5}$  mutací na lokus při jedné replikaci u kvasinek a kolem  $10^{-3} - 10^{-4}$  u myši nebo u člověka). To je mnohem více než u bodových mutací obecně ( $10^{-9} - 10^{-10}$ ). Tato vysoká míra mutací u mikrosatelitů je způsobena především díky sklouznutí řetězce během replikace (tzv. *DNA slippage*), které může vyústit jak ve ztrátu, tak či v připojení jedné opakující se jednotky – *stepwise mutation model* – anebo mohou být případně ztraceny či připojeny mnohonásobné repetice - *infinite alleles model*. Existují také důkazy připouštějící, že mutace mikrosatelitů jsou způsobovány počtem a velikostí opakujících se motivů a také komplexitou mikrosatelitů, např. jestli jsou složeny z jednoho či několika opakujících se motivů (Freeland 2005).

Mikrosatelity nejsou příliš vhodným nástrojem pro studium evolučních událostí, které se staly v relativně dávné minulosti. Jejich rychlá mutační schopnost a tendence jak ke snižování, tak i nárůstu velikosti tedy může vést ke vzniku alel, které sice mají stejnou velikost a mohou tak být pokládány za kopie pocházející ze stejného předka, nicméně jejich evoluční historie je ve skutečnosti odlišná. Tento fenomén je známý jako homoplázie (*size homoplasy*). Na druhou stranu vysoká míra mutační rychlosti mikrosatelitů umožňuje často vznik mnoha alel v každém lokusu a vysoký stupeň polymorfismu je předurčuje k použití pro studie populačních událostí v nedávné minulosti (Freeland 2005, Pénzes et al. 2002). Velmi vhodné je využití mikrosatelitů také u rostlin s předpokládaným převažujícím klonálním způsobem rozmnožování. Vysoká variabilita, kodominance a vzrůstající dostupnost mikrosatelitů z nich činí



nejoblíbenější typ markerů. Vzhledem k uvedeným vlastnostem byly SSR markery vybrány jako nejvhodnější i pro účely této studie. Kromě toho byly mikrosatelity testovány již dříve na vybraných druzích *Salix* spp. (viz Barker et al. 2003, Stamati et al. 2003), což značně usnadnilo jejich výběr.

## **2.2. Dominantní markery**

Jsou známé také jako multilokusové markery, protože se s nimi současně získávají data z několika lokusů. Typické je použití náhodných primerů k amplifikaci neznámých úseků genomu a vznik paternu několika bandů u každého jedince. Protože se používají náhodné primery, není třeba znát předem žádnou sekvenci a tedy vývoj těchto markerů není časově ani tolik náročný na rozdíl od předchozích typů. Dominantní markery navíc často vykazují obstojně velký stupeň polymorfismu a mohou být použity pro studium genetických vztahů blízce příbuzných organismů, ale nehodí se již pro studia evolučně vzdálenějších vztahů. Nevýhodou markerů tohoto typu je neschopnost rozlišovat homozygoty a heterozygoty, což znesnadňuje výpočet alelových frekvencí. Další problém může představovat také anonymita dominantních markerů při detekci kontaminací a porovnávání dat mezi různými studiemi (Freeland 2005).

### **2.2.1. RAPD**

RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) je rychlá a jednoduchá technika pro fingerprinting DNA z roku 1990 založená PCR reakcí. RAPDs jsou vytvářeny pomocí krátkých (10 bp) náhodných primerů v PCR reakci. Z 10 bází může vzniknout až milion možných primerů, takže máme k dispozici široký prostor k detekci polymorfismu pomocí různých primerů. Použitím různých primerů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA dochází k nasedání těchto primerů s vysokou pravděpodobností na více místech obou řetězců DNA. Výsledkem je amplifikace velkého počtu fragmentů s různou délkou a rozdílným molárním množstvím (Šmarda et al. 2005). Pattern bandů každého jedince bude záviset na tom, kde jsou lokalizována vhodná místa pro připojení primerů napříč genomem jedince. Ačkoliv RAPD představuje poměrně rychlou a přímou metodu pro kvantifikaci genetické podobnosti mezi jedinci, její reprodukovatelnost závisí na striktně dodržovaných laboratorních podmínkách a potýká se také s interpretačními problémy. Amplifikace bandů bude často

různá, závisící na mnoha faktorech (koncentrace DNA, parametry PCR reakce, typ přístroje, druh použitých chemikálií atd.) a výsledky se často velmi liší mezi pracovišti. Pokud ale překonáme nevýhody týkající se kontaminací a reprodukovatelnosti, lze RAPD použít ke studiu genetické podobnosti mezi dvěma jedinci založené na počtu bandů, které spolu sdílejí. Avšak vzhledem ke všem negativním vlastnostem se od jejich používání v současné době upouští (Freeland 2005).

### **2.2.2. AFLP**

Na rozdíl od předchozích jsou AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) markery, založené také na PCR reakci, sice poněkud náročnější na použití, nicméně jsou také spolehlivější (Freeland 2005). Postup této metody se skládá ze čtyř základních kroků. Nejprve dojde k úplnému rozštěpení DNA pomocí restričních endonukleáz tak, že jeden řetězec přesahuje jednou či několika bázemi a vytváří se tzv. lepivé konce. V další fázi jsou k DNA připojeny oligonukleotidové adaptory, které jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restričních míst. Restriční fragmenty jsou poté selektivně amplifikovány pomocí jednoho nebo dvou AFLP-primerů. Specifita primerů se obvykle zvyšuje přidáním jednoho až tří nukleotidů na jednom konci sekvence, čímž je dosaženo amplifikace pouze části adaptovaných fragmentů a dochází tedy k selektivnímu výběru pouze malé části z velkého množství až desetitisíců původních fragmentů vytvořených štěpením DNA. Po elektroforetické separaci tímto způsobem získáme mnoho kopií fragmentů, které se projevují jako série různě velkých bandů na polyakrylamidovém gelu. Pattern bandů závisí na ztrátě či získání restričního místa a také na vzdálenosti mezi nimi. V porovnání s RAPD je tato metoda více reprodukovatelná, přesto se i tato metoda potýká s reprodukovatelností v odlišných laboratorních podmínkách. Výhodou této metody rovněž je, že na její provedení stačí jen relativně malé množství DNA. Pomocí AFLP můžeme studovat genetickou podobnost jedinců i populací (Pénzes et al. 2002, Šmarda et al. 2005, Freeland 2005).

### 3 CÍLE PRÁCE

Vrba dvoubarvá je vzácným a kriticky ohroženým taxonem české květeny. Vyskytuje se pouze v Obřím Dolu v Krkonoších v relativně malém počtu jedinců. Na lokalitě rostou výhradně samičí rostliny a rozmnožování tohoto druhu se tedy může uskutečňovat pouze vegetativní cestou. Zjištění genetické variability populací vzácných druhů má zásadní význam pro zajištění jejich vhodného managementu. Znalost genetické variability prozradí leccos o historii druhu, ale je potřebná také při posuzování jeho budoucího osudu. V ochraně řady ohrožených taxonů nacházejí čím dál častěji uplatnění molekulární markery.

Hlavními cíli této práce je 1) otestování molekulárních markerů a jejich použití pro další studium skupiny vrby bobkolisté. 2) Pomocí mikrosatelitů bude zhodnocena genetická struktura krkonošských populací vrby dvoubarvé. Výsledky budou přínosné pro ochranu vrby dvoubarvé a do budoucna by také měly pomoci objasnit vztahy v rámci skupiny vrby bobkolisté.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1. Rostlinný materiál

Pro molekulární analýzy vzorků *Salix bicolor* byl použit materiál z herbářových sbírek (BRNL, BRNM, BRNU a MP; Hradílek et al. 1992) a také z vlastních sběrů v Arboretu Nový Dvůr. Vzorky *Salix phylicifolia*, které byly využity jako srovnávací materiál, pocházejí z terénních sběrů (Švýcarsko, Walliské Alpy, 2009) a z herbářových dokladů (Slovensko). V případě terénních sběrů, z každé rostliny bylo odebráno vždy 4-5 listů, které byly v případě čerstvého materiálu co nejrychleji vysušeny v silikagelu a pro další použití uchovávány v papírových sáčkách v suchu a temnu při pokojové teplotě.

### 4.2. Izolace genomické DNA

Pro izolaci DNA byla zvolena CTAB metoda podle protokolu Doyle & Doyle (1987) s některými mírnými úpravami. Přibližně 50 mg sušených listů (tj. ca 1,5 listu) s odstraněnou střední žilkou a řapíkem bylo homogenizováno pomocí homogenizátoru Retsch Mixer Mill MM 301 a extrahováno v 700  $\mu$ l 2% CTAB pufru (2% CTAB; 0,1 M Tris HCl, pH=8,0; 0,02 M EDTA, pH=8,0; 1,4 M NaCl; 1% PVP40) a 2  $\mu$ l  $\beta$ merkaptoethanolu a následně inkubováno na třepačce při 65 °C alespoň 60 minut. Poté bylo přidáno 700  $\mu$ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1, důkladně protřepáno a centrifugováno (13 tis. rpm, 15 min., 10 °C). Tímto způsobem dochází k denaturaci proteinů a k jejich vysrážení. Horní fáze byla poté znovu opatrně přenesena do stejného objemu (500  $\mu$ l) směsi chloroformu a isoamylalkoholu, protřepána a opět centrifugována viz předchozí krok. Dále byla horní fáze přenesena do stejného objemu (400  $\mu$ l) vychlazeného isopropanolu (-20 °C), směs byla promíchána a nechala se precipitovat při +4 °C minimálně 30 minut nebo přes noc. Následně byla směs centrifugována (13 tis. rpm, 15 min., 4 °C), supernatant odebrán a usazený pelet se nechal proschnout a poté rozpustit v 200  $\mu$ l 10 $\times$  TE pufru. Poté bylo přidáno 0,5  $\mu$ l RNAsy (10 mg/ml) k odstranění nežádoucí RNA a roztok byl inkubován 30 minut při 37 °C na třepačce. Dále bylo ke směsi přidáno 20  $\mu$ l acetátu sodného a dvojnásobek objemu 96% ethanolu (440  $\mu$ l, -20 °C) a nechalo se precipitovat alespoň 30 minut při +4 °C. Takto došlo k účinnému vysrážení deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Po

centrifugaci (13 tis. rpm, 15 min., 4 °C) byl supernatant opatrně odstraněn a zbylý pelet dvakrát promýván 700 µl 80% ethanolu pro odstranění zbytků solí, centrifugován (13 tis. rpm, 10 min., 10 °C), dále dvakrát promýván 700 µl 70% ethanolu a znovu centrifugován (13 tis. rpm, 10 min., 10 °C). Takto přečištěný pelet byl vysušen (Savant SpeedVac Concentrator) a rozpuštěn v 50 µl 1× TE pufru (10 mM Tris HCl, pH=8,0; 1 mM EDTA, pH=8,0).

Kvalita a množství získané DNA byla předběžně stanovována na 1,5% agarózovém gelu a dále také pomocí spektrofotometru, přičemž hodnoty koncentrací získané spektrofotometricky byly použity pro konečné naředění izolátu na koncentraci 5 ng/µl v 1× TE pufru. Zásobní roztoky DNA byly dlouhodobě skladovány v mrazícím boxu při -20 °C.

### 4.3. PCR reakce

Pro studium genetické variability *Salix phylicifolia* agg. byly použity vybrané mikrosatelitní markery, které již byly publikované pro jiné druhy vrb (Barker et al. 2003, Stamati et al. 2003). Optimalizace jednotlivých mikrosatelitů byla prováděna pro každý zvlášť. Master mix byl namíchán podle doporučení výrobce, tj. 5,75 µl dd H<sub>2</sub>O, 2 µl 10× Go Taq Bufferu, 0,2 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Forward a 0,5 µl Reverse primeru (20 µM), 0,05 µl Go Taq polymerázy (Promega) a 1 µl templátové DNA o koncentraci 5 ng/µl. Celkový objem reakční směsi činil 10 µl pro každý vzorek. Polymerázová řetězcová reakce probíhala na přístroji Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research).

Pro zjištění optimální annealingové teploty primerů byly nejprve prováděny teplotní gradienty. V závislosti na použitém mikrosatelitu v rozpětí buď 48-58 °C (jednotlivé kroky 48,0 °C; 48,3 °C; 48,9 °C; 49,7 °C; 50,8 °C; 52,3 °C; 54 °C; 55,4 °C; 56,5 °C; 57,3 °C; 57,8 °C; 58,0 °C) nebo 55-65 °C (s jednotlivými teplotami 55,0 °C; 55,3 °C; 55,9 °C; 56,7 °C, 57,8 °C, 59,3 °C; 61,0 °C; 62,4 °C; 63,5 °C; 64,3 °C; 64,8 °C; 65 °C). Na základě zjištění teploty vhodné pro specifické nasednutí primerů byly ještě upravovány počty cyklů PCR reakce. Jinak PCR podmínky sledovaly protokol podle výrobce (počáteční denaturace pro Go Taq polymerázu při 95 °C 2 minuty a dále cyklicky se opakující denaturace 95 °C 30 sekund, annealing při různých teplotách po

dobu 30 sekund, elongace řetězců při 72 °C 30 sekund, konečná elongace při 72 °C 5 minut a na závěr zchlazení na 4 °C).

Přítomnost vzniklých PCR produktů byla ještě vždy ověřována jejich separací na 1,5% agarózovém gelu s následnou vizualizací v UV transluminátoru.

#### **4.4. Fragmentová analýza na polyakrylamidovém gelu**

Analýza získaných PCR produktů byla prováděna vertikální elektroforetickou separací fragmentů na denaturačním 6% polyakrylamidovém gelu. Tento gel byl připraven ze 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu (150 ml 40% akrylamidu, 420 g močoviny, 50 ml 10× TBE, 484 ml ddH<sub>2</sub>O); 46,7 µl N, N, N', N'-tetramethylendiaminu a 467 µl (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Před nanesením gelu bylo sklo ještě ošetřeno 3 µl silanu, pro dobré přilnutí gelu ke sklu. PCR produkty byly nejprve denaturovány v denaturačním pufru (formamid a loading dye v poměru 9:1) 3 minuty při 96 °C na předehřátém termocycleru, přičemž byl smíchán 1 díl vzorku s ½ pufru. Pro elektroforetickou separaci (při 120 mA, 2000 V) bylo nanášeno vždy 3,5 µl vzorku. Obvyklá doba separace se pohybovala od 2 do 2,5 hodiny v závislosti na délce fragmentů. Poté se na gel nechal působit přibližně 20 minut 10% roztok CH<sub>3</sub>COOH pro fixaci DNA a odstranění močoviny, následovalo 3x promývání ddH<sub>2</sub>O, 5 minut v 1% HNO<sub>3</sub> a opět 3x promytí deionizovanou vodou. Gel byl potom barven pomocí 0,1% AgNO<sub>3</sub> s přídavkem 0,15% formaldehydu a tento roztok působil 30 minut. Po dalším promytí vodou byly ionty stříbra redukovány ve vychlazeném 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (s přidaným 0,15% formaldehydem a 1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), což se opticky projevilo vyvíjením hnědočerných, stříbrem obarvených proužků PCR produktů. V momentu, kdy byly bandy již dostatečně zřetelné, se vyvíjení zastavilo přilítím 10% CH<sub>3</sub>COOH a tento roztok se nechal působit přibližně 2 minuty (tj. do doby, kdy z roztoku přestaly masivně unikat bublinky CO<sub>2</sub>). Poté bylo sklo s gelem ponořeno ještě na 2 minuty do ddH<sub>2</sub>O a následně přeneseno do sušárny, kde se gel při 60 °C po dobu 1 hodiny vysušil a byl takto připravený k vyhodnocení.

## 5 VÝSLEDKY

### Údaje o rozšíření *Salix bicolor* v ČR

Revizí herbářových položek z veřejně přístupných sbírek (BRNM, BRNL, BRNU, LIT, OLM, ČB, MP) bylo v předchozí bakalářské práci (Nývtová 2009) zmapováno historické rozšíření vrby dvoubarvé v České republice. Z těchto položek byl odebrán materiál pro extrakci genomické DNA. Všechny vzorky vrby dvoubarvé pocházejí z Krkonoš, kde byly sbírány buď na své přirozené lokalitě v Obřím Dolu anebo z nařízkovaných rostlin v zahradě Josefa Šourka a z Arboreta Nový Dvůr, které mají původ také v Obřím Dolu.

### Historické rozšíření *Salix bicolor* v ČR

#### Oreofytikum:

**93b. Krkonoše subalpínské:** Studniční hora („Brunnberg, Riesengebirge“) (4. VII. 1925 *Thenius*, BRNM; 9. VII. 1946 *Krčan*, OLM). - Obří důl („Riesengrund“) (21. VIII. 1879 *Freyn*, BRNM; 1893 *Schulz*, BRNU; 27. VI. 1928 *s. coll.*, BRNM; 25. IX. 1971 *Chmelař*, BRNL; s. dat. *Šmarda*, BRNM). - Hřeben Kotle (12. VII. 1933 *Horák*, LIT). - Sněhový žlab („Schneeграben“) (9. VII. 1937 *s. coll.*, OLM; VII. 1945 *Šourek*, LIT; 16. VII. 1953 *Černoch*, BRNM; 20. VIII. 1953 *Horák*, MP). - Krakonošova zahrádka (29. IX. 1950 *Čábera*, CB; 15. VIII. 1950 *Kurka*, CB, BRNL, BRNM; 22. VI. 1968 *Haubschel*, BRNL. – Zahrada Josefa Šourka v Peci pod Sněžkou (1965 *Horák*, MP; 1971 *Horák*, MP)

#### Nelokalizovatelné a příliš široce lokalizované údaje:

Asciburgii montes, Bohemia (s. dat., *s. coll.*, BRNM) [položka pochází z Freynova herbáře]; Krkonoše (s. dat. *Tausch*, OLM)

#### Pochybné nebo sporné údaje:

93b. Krkonoše subalpínské: Hřeben Kotle (1933 *Horák*, LIT) [patrně záměna s jiným druhem]

## Doplňující literární údaje:

93b. Krkonoše subalpínské: Labský vodopád (Mosch 1858)

### 5.1. Izolace genomické DNA

Pro extrakci DNA byl použit materiál ze sušených listů jednak z herbářových položek a dále také z vlastních sběrů vysušených silikagelem. DNA byla získána z celkem 30 rostlin, při čemž 23 vzorků *Salix bicolor* pocházelo z herbářových položek a 1 z arboreta Nový Dvůr. Zbýlých 6 vzorků *Salix phylicifolia* bylo použito jako materiál pro srovnání, z toho 4 pocházejí ze Švýcarských Alp a 2 z Tater.

Množství vyextrahované DNA bylo velmi proměnlivé. Koncentrace DNA v ng/μl se pro kontrolu měřila opakovaně pomocí dvou různých typů spektrofotometrických přístrojů. Za přesnější považuji spektrofotometr NanoDrop 1000. Nejnižší naměřená hodnota byla 21,67 ng/μl, což je dostačující množství, a nejvyšší zjištěná hodnota byla 559,53 ng/μl. Tyto hodnoty jsou ale extrémní, většina vzorků dosahovala průměrné koncentrace DNA kolem 80 ng/μl. Kvalita získané DNA, zjištěná z poměru absorbcí A<sub>260/280</sub>, byla poměrně dobrá. Za optimální se považují hodnoty A<sub>260/280</sub> v rozmezí 1,8-2.

**Tabulka 2: Koncentrace extrahované DNA jednotlivých vzorků.**

vzorek	koncentrace DNA [ng/μl ]	A 260/280
Bic26	108,16	1,64
Bic27	35,39	1,65
Bic28	23,93	1,95
Bic29	28,55	1,82
Bic30	28,61	1,52
Bic31	75,14	1,92
Bic32	21,67	1,50
Bic33	64,51	1,66
Bic34	179,15	1,11
Bic35	141,50	1,37
Bic36	71,34	1,51
Bic37	91,56	1,45



Bic38	121,5	1,82
Bic39	158,10	1,39
Bic40	174,07	1,11
Bic41	184,56	1,82
Bic42	172,29	1,14
Bic43	333,29	1,20
Bic44	59,1	1,63
Bic45	339,15	1,16
Bic46	32,40	1,67
Bic47	67,66	1,57
Bic48	35,85	1,76
BicND	31,03	2,19
PhyI	559,53	2,02
PhyII	162,07	1,86
PhyIII	335,06	1,82
PhyIV	410,36	1,94
Phy49	97,52	1,44
Phy50	149,96	1,99

## 5.2. Testování a charakterizování mikrosatelitů

Pro studium genetické variability vrby dvoubarvé a vrby bobkolisté bylo testováno celkem 12 primerových párů. Pouze u 6 z nich se prozatím podařilo stanovit vhodné podmínky, které poskytují hodnotitelný výsledek. Konkrétně se jedná o mikrosatelity s označením sx8, sx10, sx12, sx14, sx18 a sx23 (viz Tab. 3). Podmínky pro tyto primery musely být optimalizovány úpravou počtu cyklů během PCR reakce a také úpravou annealingové teploty pomocí střídání teplotních gradientů, protože podmínky pro tyto mikrosatelity uvedené v literatuře byly optimalizovány pro jiné druhy vrb a pro *Salix bicolor* resp. *Salix phylicifolia* nejsou vhodné. U zbývajících 6 mikrosatelitů se nepodařilo nalézt takové podmínky, které by poskytly skórovatelné výsledky.

**Tabulka 3: Použité mikrosatelitní primery, podle Barker et al. 2003.** U mikrosatelitů, pro které se podařilo optimalizovat podmínky, je uvedena annealingová teplota ( $T_a$ ) a počet opakovaných cyklů (C) během PCR.

Název	Sekvence primeru (5'-3')	Opakovaný motiv	Původní označení	$T_a$ [°C]	C
Sx08	F: ACTTCAATCTCTCTGTATTCT R: CTATTTATGGGTTGGTCGATC	[TG] <sub>21</sub> AG[TG] <sub>3</sub> AG [TG] <sub>3</sub> AG[TG] <sub>3</sub> AG TGAG[TG] <sub>3</sub>	SB24	52	34
Sx10	F: TAATGGAGTTCACAGTCCTCC R: ATACAGAGCCCATTTCATCAC	[TC] <sub>21</sub>	SB80	65	30
Sx12	F: TATTGCTTTGATGGCGACTGC R: CAGCAACGGAAATAGCAACAG	[ACCGCC] <sub>5</sub> ACCGC	SB88	58	34
Sx14	F: ATGTCATTCAGGTTTGTTTTC R: ATGGTTTAACTTGTTACTGTA	[CCG] <sub>5</sub>	SB100	50	34
Sx18	F: CTGTTTCCTGCCACTATTAC R: TATAATCTGTCTCCTTTTGGC	[GCC] <sub>9</sub>	SB196	55	34
Sx19	F: CTATTTGTTCTCAATACCTT R: CTTTACCTCAGAAAATCCAGA	[TG] <sub>11</sub> CG[TG] <sub>6</sub>	SB199		
Sx20	F: CCTCTTTTTCTATTGTGGTCT R: GGCATGTATTTTTACTCCAAC	[CT] <sub>4</sub> CC [CT] <sub>3</sub> [CA] <sub>22</sub>	SB201		
Sx13	F: GACGCACATACACCATTACAC R: TGTTAGAAAATTAGGCACGGA	[GT] <sub>17</sub>	SB93		
Sx22	F: TATAAAGACAAATACCTGGGG R: CATCAAAGACTGCTAGAAAGG	[CA] <sub>2</sub> [GA] <sub>2</sub> GGAA [TA] <sub>2</sub> [CA] <sub>15</sub> GA	SB210		
Sx23	F: AAATTACCGTCCAATAAAGA R: CATTAGCCATGAACAAGTAAA	[TA] <sub>2</sub> [TGTGCG] <sub>4</sub> [TG] <sub>9</sub>	SB233	50	34
Sx24	F: ATTCCTTTCTTCATCAGTAGC R: GACAACGCCATTCACATGACC	[GCC] <sub>3</sub> ATCATT CCCC[GCC] <sub>4</sub>	SB243		
Rbs19	F: TCATTTGCTCGATGAGGTTG R: GTGGTAGTTGAAAAGGGGA	[CT] <sub>10</sub>	gSIMCT024		

Zjištěné počty alel pro jednotlivé mikrosatelity, získané elektroforetickou separací PCR produktů na polyakrylamidovém gelu, shrnuje následující tabulka. Všechny rostliny vrby dvoubarevné vykazovaly shodný genotyp, proto jsou zde uvedeny jako jedna položka pro lepší přehlednost. Vzorky vrby bobkolisté *S. phyllicifolia* 1-4 jsou z alpských populací a *S. phyllicifolia* 5-6 z Tater.

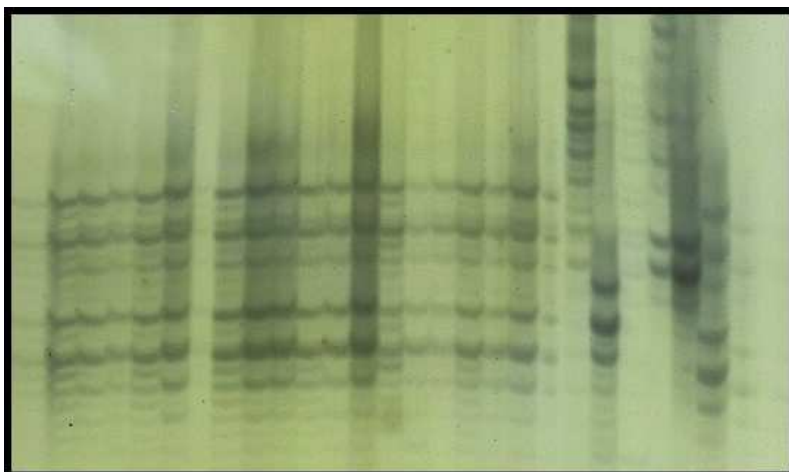
**Tabulka 4: Oskórované alely přítomné ve vzorcích pro jednotlivé mikrosatelity.**

vzorek	sx8	sx10	sx12	sx14	sx18	sx23
<i>S. bicolor</i>	ABCD	ABCD	ABC	ABCD	ABCD	ABCD
<i>S. phyllicifolia</i> 1	EFG	-	DE	-	E	E
<i>S. phyllicifolia</i> 2	HCD	-	EF	-	-	FG
<i>S. phyllicifolia</i> 3	-	-	EF	-	-	EG
<i>S. phyllicifolia</i> 4	EFG	-	D	-	-	H
<i>S. phyllicifolia</i> 5	G	-	E	-	-	IJKM
<i>S. phyllicifolia</i> 6	CD	-	ABG	-	-	IJLM

Před elektroforetickou separací PCR produktů byly vzorky nanášeny na gel vždy v pořadí *S. bicolor* z herbářových položek, *S. bicolor* z arboreta Nový Dvůr, *S. phyllicifolia* z Alp a *S. phyllicifolia* z Tater.

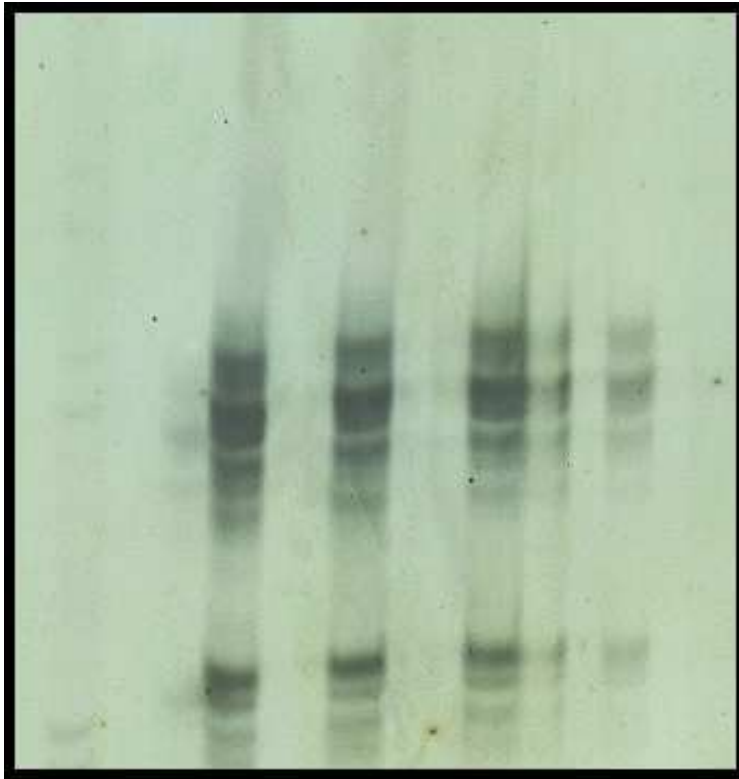
Na základě vizualizace bandů na polyakrylamidovém gelu bylo pro mikrosatelit sx8 zjištěno celkem 8 alel. U vrby dvoubarevé byly přítomny 4 alely A, B, C a D, prokázané u všech vzorků. Krkonošské rostliny tedy mají pouze jeden genotyp. Vyhodnocení alel u vzorků vrby bobkolisté již nebylo tak jednoznačné. U alpských rostlin byly přítomné alely C, D, E, F, G a H, přičemž *S. phyllicifolia* 1 a 4 měly shodný genotyp EFG, *S. phyllicifolia* 2 měla genotyp HCD. Rostliny z Tater měly 3 alely C, D a G. Jejich genotypy se navzájem liší. Alely C a D se vyskytují společně u vrby dvoubarevé a vrby bobkolisté z obou evropských lokalit.

**Obrázek 2: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx8.**



Pro mikrosatelit sx10 se na polyakrylamidovém gelu podařilo identifikovat 4 alely A, B, C a D a to pouze pro vrbu dvoubarvou. Genotyp všech rostlin byl stejný. U vrby bobkolisté se bohužel nepodařilo získat prokazatelný výsledek, počet alel se nedal jednoznačně určit.

**Obrázek 3: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx10.**



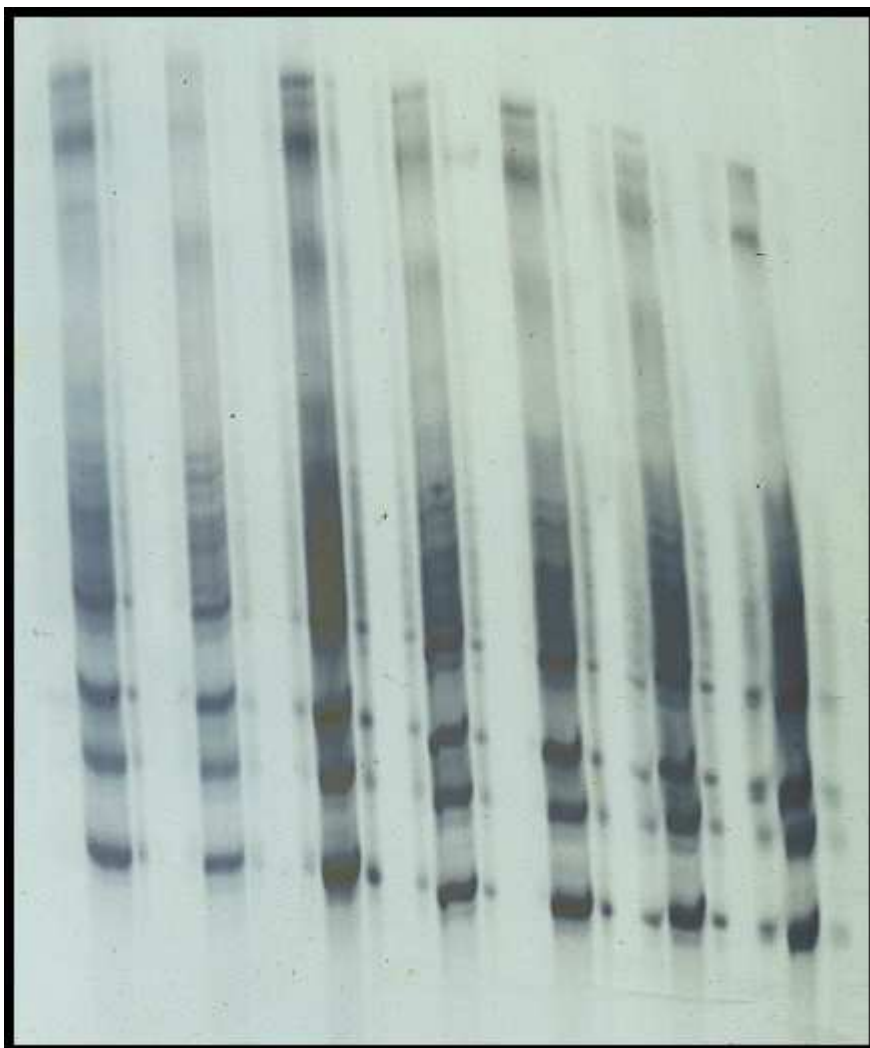
Pro mikrosatelit sx12 bylo zjištěno celkem 7 alel. U vrby dvoubarvé měly všechny vzorky 3 alely A, B a C a opět shodný genotyp. U vrby bobkolisté ze Švýcarských Alp byly přítomny 3 různé alely D, E a F ve třech různých genotypech. *S. phylicifolia* 2 a 3 měly genotyp stejný. Rostliny z Tater měly přítomné 4 alely A, B, E a G, každá s jiným genotypem. Alely A a B se objevovaly shodně u *Salix bicolor* a u *S. phylicifolia* 6., alela E byla u alpských rostlin *S. phylicifolia* 1, 2, 3 a u tatranské *S. phylicifolia* 5.

**Obrázek 4: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx12.**



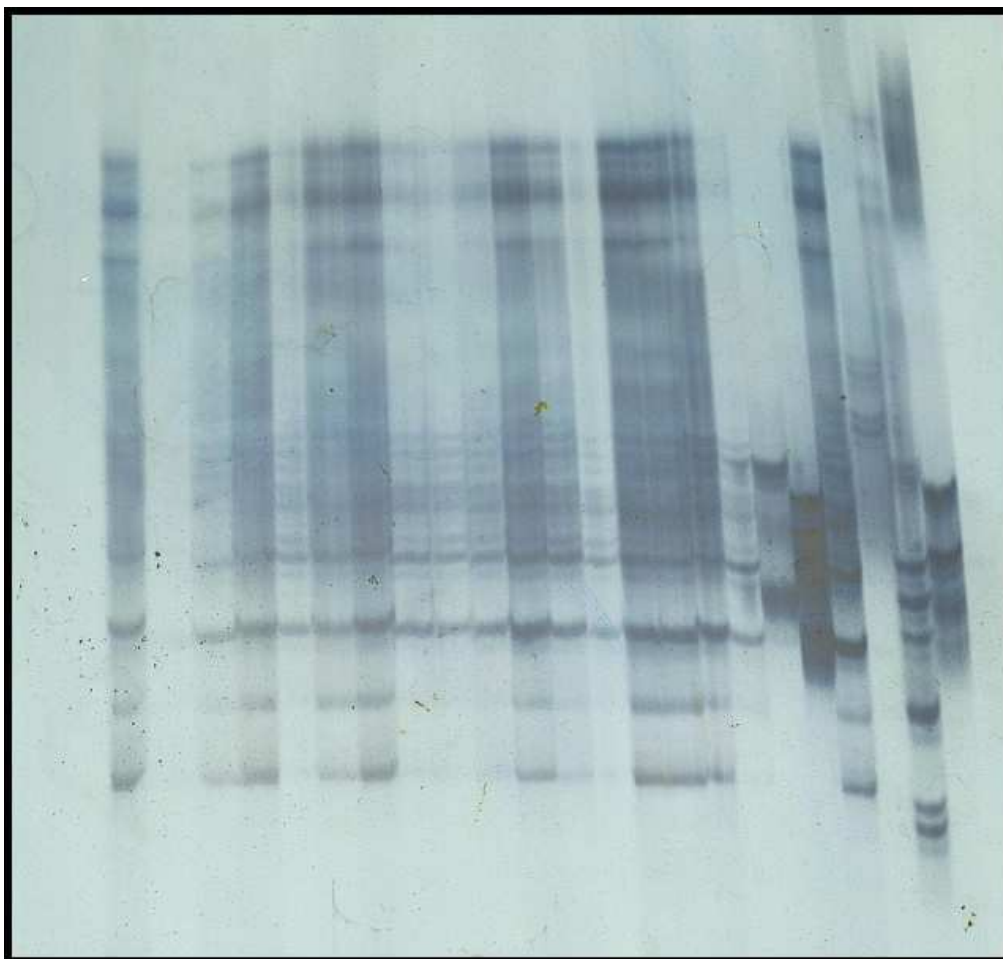
Pro mikrosatelit sx14 byly zjištěny 4 různé alely A, B, C a D a to pouze v případě *S. bicolor*. Všechny rostliny vykazovaly opět stejné rozložení bandů. U *S. phyllicifolia* se nepodařilo získat hodnotitelný výsledek.

**Obrázek 5: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx14.**



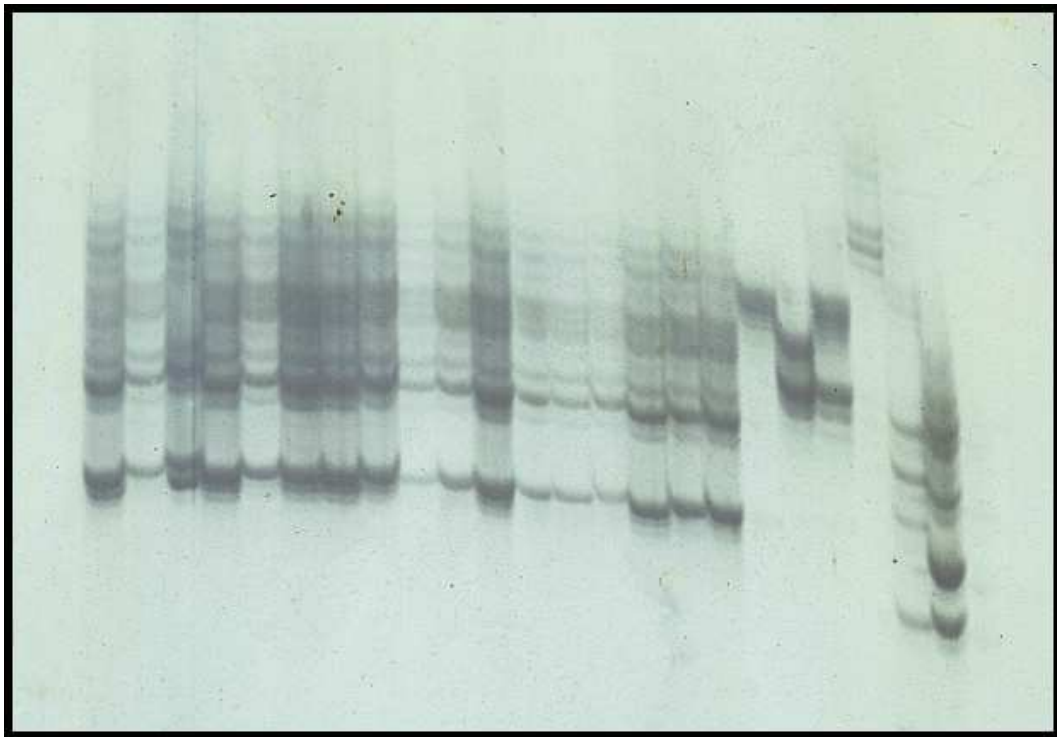
U mikrosatelitu sx18 byla situace velmi podobná. Také zde byly přítomny 4 alely A, B, C a D v případě vrby dvoubarvé a u všech rostlin se jednalo o tentýž genotyp. U vrby bobkolisté se bohužel nepodařilo získat skórovatelné alely, pouze u vzorku *S. phyllicifolia* 1 z Alp byla přítomna alela E.

**Obrázek 6: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx18.**



Pro mikrosatelit sx23 bylo zjištěno celkem 13 alel. U vrby dvoubarvé byly přítomny 4 alely A, B, C a D. Všechny vzorky měly shodný genotyp. U vrby bobkolisté z alpských populací byly také 4 alely E, F, G a H, každý vzorek měl odlišný genotyp. Alela E byla společná vzorkům *S. phyllicifolia* 1 a 3. Rostliny *S. phyllicifolia* 2 a 3 měly shodnou alelu G. U vrby bobkolisté z Tater bylo přítomno celkem 5 alel I, J, K, L a M, přičemž oba vzorky měly společné alely I, J a M.

**Obrázek 7: Sken polyakrylamidového gelu s mikrosatelitem sx23.**





## **6 DISKUZE**

### **6.1. Izolace genomické DNA**

Pro testování mikrosatelitních markerů bylo vybráno celkem 30 vzorků rostlin, ze kterých byla extrahována genomická DNA. 24 vzorků představovalo rostliny vrby dvoubarvé a zbylých 6 vzorků pak rostliny vrby bobkolisté. Rostlinný materiál pocházel buď z herbářových položek (v případě vrby dvoubarvé a vrby bobkolisté v Tatrách) anebo ze sběrů v terénu ve Švýcarsku (vrba bobkolistá) a z arboreta v Novém Dvoře (vrba dvoubarvá). Tyto vzorky byly bezprostředně po odebrání vysušeny v silikagelu.

Modifikovaný protokol CTAB metody podle Doyle & Doyle (1987) byl na Katedře Botaniky vyzkoušen již na několika jiných druzích vrb a ukázal se jako vhodný i pro druhy ze skupiny vrby bobkolisté. Pro pufráční schopnosti CTABu je optimální použití přibližně 50 mg sušeného listového materiálu, který odpovídá 200 mg čerstvého pletiva (Brandová 2010). Při dlouhodobějším skladování v mrazáku docházelo u některých vzorků ke vzniku gelovité konzistence. S takovými vzorky již nebylo možné dále pracovat a musela u nich být provedena znovu extrakce. Možnou příčinou by mohla být přítomnost obsahových látek specifických pro vrbu dvoubarvou. Při krátkodobém skladování se ale tento problém neprojevoval.

Koncentrace vyextrahované DNA značně kolísala u jednotlivých vzorků. Nejčastěji se ale její hodnoty pohybovaly kolem 80 ng/μl. I u nejnižších naměřených hodnot byla koncentrace stále dostatečná pro další použití. PCR reakce je velmi citlivá, proto postačí i poměrně malé množství DNA na získání velkého množství kopií fragmentů (Vašut osobní sdělení).

### **6.2. Testování mikrosatelitů**

Účelem této diplomové práce bylo otestování mikrosatelitů a jejich aplikace pro studium genetické variability na dostupném materiálu vrby dvoubarvé. Bylo testováno celkem 12 mikrosatelitních markerů vybraných podle prací Barkera et al. (2003) a Stamatihio et al. (2003). U 6 z nich se podařilo optimalizovat podmínky pro druhy ze skupiny vrby bobkolisté, což je pro účely této studie dostatečný počet. V budoucnu ale

výzkum bude pokračovat a testovány, respektive optimalizovány budou ještě další mikrosatelity.

Ze všech dostupných molekulárních markerů byly mikrosatelity díky svému charakteru vybrány jako nejvhodnější pro tuto práci. V minulosti již byla genetická variabilita vrby dvoubarvé některými autory zkoumána. V dosud publikovaných pracích ovšem byly prováděny vždy pouze isoenzymové analýzy. Metody, které jsou založeny na použití enzymatických systémů k hodnocení variability, jsou časově nenáročné, relativně levné a snadné na provedení, nicméně mají i některé nevýhody. Isoenzymy totiž představují funkční varianty proteinů a jako takové tedy nemohou odrážet veškerou variabilitu na úrovni genomové. Jejich informační hodnota je proto omezená. Navíc nejsou selekčně neutrální a podléhají tedy selekčním tlakům (Pénzes et al. 2002). Výsledky isoenzymových analýz jsou také závislé na laboratorních podmínkách. Naproti tomu metody, ve kterých se používají mikrosatelity v dostatečném počtu, jsou velmi robustní (Vašut osobní sdělení). Mikrosatelitní markery se vyznačují vysokou variabilitou, jsou přirozeně kodominantní (lze s nimi tedy identifikovat homozygoty i heterozygoty) a s rozvojem nových sekvenčních metod stále více dostupnější (Freeland 2005). Díky těmto vlastnostem proto byly využity pro diplomovou práci.

Genetickou variabilitou vrby dvoubarvé z krkonošských populací se zabývali Chrtek et al. (2007). Ke studiu vybrali 12 rostlin, u nichž byly všechny lokusy monomorfické. Jednalo se tedy o jeden klon. Ve svojí práci jsem se snažila tento výsledek na omezeném dostupném rostlinném materiálu potvrdit/vyvrátit pomocí mikrosatelitů. Touto metodou by bylo teoreticky možné odhalit alespoň minimální variabilitu a prokázat přítomnost více než jednoho genotypu, jako tomu bylo např. v případě vrby bylinné, kde bylo zjištěno u populace na Studniční stěně 5 genotypů s použitím isoenzymů (Chrtek et al. 2007) a 7 genotypů s použitím mikrosatelitů (Ševčík 2012). Ovšem u vrby dvoubarvé se ani po analýze mikrosatelitů neprokázala žádná variabilita a všechny testované rostliny měly shodný genotyp. Zajímavé při tom je, že stejně jako vrba dvoubarvá ve Sněhovém žlabu se i vrba bylinná na Studniční stěně vyskytuje pouze v samičím pohlaví. Přítomnost různých genotypů u vrby bylinné poukazuje na to, že zde dříve pravděpodobně byly zastoupeny také rostliny samčí. Přestože tato studie prokázala 100% klonální charakter rostlin v Krkonoších, je nutné tento výsledek považovat za předběžný. Tento výsledek bude zapotřebí zpřesnit terénním sběrem vzorků všech jedinců ve stávající populaci.

U vrby je celkem běžným jevem vychýlený poměr pohlaví ve prospěch samičích jedinců. Jako jeho příčiny se uvádí vysoká mortalita samčích jedinců, rozdílná schopnost obou pohlaví kolonizovat biotopy a rozdílný tlak herbivorů na pohlaví (Alliende & Harper 1989). Tím je možné vysvětlit, proč se v těchto reliktních populacích zachovaly pouze samičí rostliny. Jediný způsob, jak se zde tyto druhy mohly dále udržovat, je tedy vegetativní rozmnožování, které je mimo jiné v takovýchto extrémních podmínkách velice běžné. Výsledkem jsou vyselektované dobře adaptované genotypy (Aravanopoulos et al. 1999). U klonálních druhů se v průběhu vývoje genetická variabilita postupně snižuje vlivem konkurence a náhodných jevů a pokud v takové populaci nedojde k přispění novými genetami, může se stát zcela uniformní s převládnutím např. i jediného genotypu (Watkinson & Powell 1993).

V malých a izolovaných populacích v glaciálních refugiích se navíc často může projevit efekt hrdla lahve (*bottleneck effect*), což má za následek sníženou genetickou diverzitu (Chrtek et al. 2007). Např. lomikámen nicí (*Saxifraga cernua*) má ve střední Evropě izolované reliktní populace oddělené od zbytku souvislejšího cirkumpolárního rozšíření. Před glaciací byl tento druh v Alpách mnohem rozšířenější než v současnosti, ale následkem zalednění byly jeho populace fragmentovány a výrazně redukovány. Pomocí RAPD markerů nebyla v recentních alpských populacích zjištěna žádná variabilita, což je pravděpodobně způsobeno právě bottleneckem a founder efektem (efekt zakladatele) během a po době ledové (Bauert et al. 1998). Podobný osud potkal mnoho dalších reliktních druhů, mimo jiné u nás např. vrbu dvoubarvou či rozrazil chudobkovitý (*Veronica bellidiodides*), jejichž populace v Krkonoších také nevykazují žádnou genetickou variabilitu (Chrtek et al. 2007).

Variabilita vrby dvoubarvé byla zkoumána pomocí isoenzymů také u německé populace rostoucí v Harzu na hoře Brocken. Použity byly dva enzymatické systémy (sorbitoldehydrogenáza a leucinamidopeptidáza), které rovněž potvrdily, že i tuto populaci tvoří jediný klon. Stejně jako v Krkonoších se i v Harzu vyskytují výhradně samičí rostliny. Samčí jedinci vrby dvoubarvé byli prokázáni pouze na lokalitě Hohneck ve Vogézách (Zander 1996).

V této diplomové práci bylo kromě vrby dvoubarvé použito k testování mikrosatelitů také 6 jedinců vrby bobkolisté ze dvou evropských lokalit: ze Švýcarských Alp a z Tater. U těchto rostlin nebylo vyhodnocování alel a identifikace genotypů tak jednoznačné jako v případě vrby dvoubarvé. Většinou bylo možné sledovat pouze

rozložení proužků na polyakrylamidovém gelu. Prozatím lze obecně říct, že charakter jednotlivých bandů se u jednotlivých vzorků lišil. Tyto výsledky jsou ale zatím předběžné a budou podrobeny dalšímu studiu. Rovněž je zřejmé, že pro srovnání jedinců *S. phyllicifolia* ze vzdálenějších regionů bude nutné zahrnout vyšší počet markerů tak, aby se vyloučil negativní vliv tzv. homoplázie.

Použité mikrosatelity byly vyvinuty pro jiné druhy vrb a podmínky uvedené v literatuře (Barker et al. 2003, Stamatii et al. 2003) nebyly pro vrbu bobkolistou a vrbu dvoubarvou vhodné. Musely být proto provedeny optimalizace, tzn. úpravy počtu cyklů během PCR reakce a zjištění ideální annealingové teploty, při které primery nasedají na komplementární místa na řetězcích DNA. Proces optimalizace je časově dosti náročný. Pro tuto diplomovou práci se mi podařilo zjistit vhodné podmínky pro 6 mikrosatelitů z celkem 12 testovaných, nicméně do budoucna bude pokračovat jejich další optimalizace. Zejména u vrby bobkolisté nebyly výsledky z polyakrylamidových gelů ideální pro oskórování alel. Tento výsledek může být způsoben výrazněji odlišnými podmínkami, které se mi v rozmezí nastavení nepodařilo nalézt. Jednou z dalších možných příčin by mohl být i fakt, že ne každý mikrosatelit je vhodný pro použití u daného druhu, a to i v okruhu několika blízkce příbuzných druhů, kde jinak mikrosatelity spolehlivě fungují. Předmětem dalšího studia bude také rozšíření počtu použitých markerů a obohacení vzorků o rostliny z dalších lokalit v rámci Evropy.

Přestože je PCR sama o sobě robustní technikou, je velmi důležité provést správně všechny předchozí kroky při pipetování PCR mixu. Mělo by se postupovat co nejrychleji, zejména po přidání polymerázy. Vzorky a ostatní chemikálie musí být chlazené, PCR mix je třeba důkladně promíchat, aby byly všechny komponenty rovnoměrně promísené.

Pro vizualizaci PCR produktů byla nejprve prováděna elektroforetická separace na 1,5% agarózovém gelu. Vzhledem k tomu, že rozlišovací schopnost tohoto gelu je nižší a také DNA tvořila jen slabé bandy, posloužila tato metoda pouze orientačně. Pro získání hodnotitelných alel byla prováděna časově i technicky náročnější elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, který má výbornou rozlišovací schopnost a dokáže odlišit i mnohem menší fragmenty.

Na výsledcích se mohou odrazit i okolní vlivy, jako např. teplota v laboratoři. Obecně v letních měsících, kdy byla získávána data pro diplomovou práci, mohou být kvůli vysokým teplotám výsledky poněkud zkresleny.

Využití mikrosatelitů je v současné době značné. Používají se v populačně genetických studiích, k identifikaci klonů a hybridů. Pro zhodnocení variability na úrovni populací jsou pravděpodobně nejlepší, proto našly uplatnění i v této studii. Vzhledem ke všem výhodám, které mikrosatelity mají, jsou významné i pro ochranu přírody. Identifikace jednotlivých genotypů, zjištění míry hybridizace a podílu sexuálního/vegetativního rozmnožování jsou důležité faktory, které je třeba brát v úvahu při výběru vhodného managementu ohrožených a vzácných druhů, jakým je např. i vrba dvoubarvá v Krkonoších.

## 7 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci, která podávala základní přehled o problematice skupiny vrby bobkolisté se zaměřením na jediného zástupce z tohoto okruhu, vyskytujícího se v České republice – na vrbu dvoubarvou.

Hlavním cílem této práce bylo otestování mikrosatelitních markerů pro studium *Salix phylicifolia* agg. Po optimalizaci byly mikrosatelity použity pro analýzu genetické struktury populace vrby dvoubarvé v Krkonoších. Celkem bylo vyzkoušeno 12 mikrosatelitních primerů, ale vhodné podmínky se podařilo najít pro 6 z nich (sx8, sx10, sx12, sx14, sx18 a sx23). Provedenou analýzou genetické variability na 26 vzorcích bylo zjištěno, že populace vrby dvoubarvé z Krkonoš, je tvořena pouze jedním klonem, tj. všechny rostliny mají shodný genotyp. V minulosti již byly prováděny analýzy této populace na jiném pracovišti a to za pomoci isoenzymů. Jejich výsledek byl totožný s touto studií, také nebyla prokázána žádná variabilita. Ani v populacích z Brockenu v německém pohoří Harz isoenzymová analýza neodhalila přítomnost více genotypů a všechny tamější rostliny mají stejné genotypy. Zajímavé také je, že jak české, tak i německé populace jsou tvořeny výhradně samičími jedinci. Rozmnožování tedy může probíhat pouze vegetativní cestou. Samčí rostliny vrby dvoubarvé jsou dokladovány pouze z Hohnecku ve Vogézách.

Jako srovnávací materiál pro mikrosatelitní analýzy v této studii posloužily také rostliny vrby bobkolisté. 4 vzorky pocházely ze Švýcarských Alp a 2 z Tater. U nich se bohužel nepodařilo identifikovat jednotlivé alely pro určení genotypu. Nadále se tak budou optimalizovat podmínky pro získání hodnotitelného výsledku. V budoucnu se také bude postupně navyšovat počet testovaných mikrosatelitů a získávat další rostlinný materiál i z jiných evropských lokalit, abychom získaly komplexnější představu o genetické struktuře a vzájemných vztazích v rámci skupiny vrby bobkolisté.

Pro účely této práce byly díky všem svým výhodám zvoleny jako nejvhodnější molekulární markery právě mikrosatelity, které mají na úrovni populací největší vypovídací hodnotu. V budoucnu by mohly být analýzy variability mikrosatelitů rovněž doplněny o analýzu AFLP markerů, a to především pro stanovení genetické vzdálenosti mezi jednotlivými taxony v rámci agregátu *S. phylicifolia*.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

ALLIENDE M. C. & HARPER J. L. (1989). Demographic studies of dioecious tree. I. Colonization, sex and age structure of a population of *Salix cinerea*. – *Journal of Ecology* 77: 1029-1047.

ARAVANOPOULOS F. A., ZSUFFA L. & CHONG K. X. (1993): The genetic basis of enzymatic variation in *Salix exigua*. – *Hereditas* 119: 77-88.

ARAVANOPOULOS F. A., KIM K. H. & ZSUFFA L. (1999): Genetic diversity of superior *Salix* clones selected for intensive forestry plantations . – *Biomass and bioenergy* 16: 249-255.

ARGUS G. W. (1986): The genus *Salix* (Salicaceae) in the southeastern United States. – *Systematic Botany Monographs* 9: 1-170.

ARGUS G. W. (1997): Infrageneric classification of *Salix* (Salicaceae) in the New World. – *Systematic Botany Monographs* 52: 1-121.

ARGUS G. W. (2007): *Salix* (Salicaceae) distribution maps and synopsis of their classification in North America, North of Mexico. – *Harvard Papers in Botany* 12(2): 335-368.

AZUMA T., KAJITA T., YOKOYAMA J. & OHASHI H. (2000): Phylogenetic relationships of *Salix* (Salicaceae) based on *rbcL* sequences data. – *American Journal of Botany* 87(1): 67-75.

BAKER A. J. (2000): *Molecular methods in ecology*. – Blackwell Sci., Oxford, New York..

BAUERT M. R., KÄLIN M., BALTISBERGER M. & EDWARDS P. J. (1998): No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. – *Molecular Ecology* 7: 1519-1527.

BEEBEE T. & ROWE G. (2004): An introduction to molecular ecology. – Oxford University Press Inc., New York, 346 pp.

BRANDOVÁ B. (2010): Hybridizace horských druhů vrb na příkladu vrby hrotolisté ve Velké Kotlině. – Diplomová práce [depon. in Katedra ekologie a životního prostředí, PřF UP, Olomouc].

BRUNNSFELD S. J., SOLTIS D. E. & SOLTIS P. S. (1991): Patterns of genetic variation in *Salix* section *Longifoliae* (Salicaceae). – *American Journal of Botany* 78(6): 855-869.

DOYLE J. J. & DOYLE J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

DUDASH M. R. & FENSTER C. B. (2000): Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. – In: Young A. G. & Clarke G. M. [eds.]: Genetics, demography and viability of fragmented populations, p. 35-53.

ELLSTRAND N. C. & ROOSE M. L. (1987): Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. – *American Journal of Botany* 74: 123-131.

FREELAND J. R. (2005): Molecular ecology. – John Wiley & Sons, Ltd., England, 388 pp.

HENDRYCH R. (1980): O reliktech a jejich přítomnosti v naší květeně II. – *Živa*, 28, č. 2, 49-53.

HEWITT G. M. (1996): Some genetic consequences of ice age and their role in divergence and speciation. – *Biological Journal of the Linnean Society* 58. 247-276.

HÖRANDL E., FLORINETH F. & HADACEK F. (2002): Weiden in Österreich und angrenzenden Gebieten. – Wien.

HRADÍLEK Z., LIZOŇ P. & TLUSTÁK V. (1992): Soupis botanických sbírek v Československu. – Vlastivědné muzeum Olomouc. 73 p.



CHASE M. W., ZMARZTY S., LLEDÓ M. D., WURDACK K. J., SWENSEN S. M. & FAY M. F. (2002): When it doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. – *Kew Bulletin* 57: 141-181.

CHEN J. H., SUN H., WEN J. & YANG Y. P. (2010): Molecular phylogeny of *Salix* L. (Salicaceae) inferred from three chloroplast datasets and its systematic implications. – *Taxon* 59(1): 29-37.

CHMELAŘ J. & KOBLÍŽEK J. (1990): 65. *Salicaceae* Mirbel – vrbovité. – In: Hejný S. & Slavík B. [eds.]: Květena ČR 2, pp. 458-495.

CHMELAŘ J. (1968). O dvou vrbách dvoubarvých, *Salix bicolor* Ehrh. a *Salix bicolor* hort. – *Zpr. Arbot. Nový Dvůr u Opavy*, 7: 6-8.

CHMELAŘ J. (1972): Poznámky k československým druhům rodu *Salix* – II. Druhy vrb vyšších poloh. – *Acta Musei Silesiae, series Dendrologica* 11: 1-16.

CHMELAŘ J. (1979): Taxonomický význam počtu chromozomů rodu *Salix* L. – *Lesnictví* 25 (LII), 5: 411-415.

CHMELAŘ J. (1985): Some comments on taxonomy and chorology of the willow species growing in Czechoslovak territory. – *Folia Dendrologica*, Bratislava, 12: 15-29.

CHRTEK J., PLAČKOVÁ I., ZAHRADNÍKOVÁ J., KIRSCHNER J., KIRSCHNEROVÁ L., ŠTĚPÁNEK J., KRAHULCOVÁ A., KRAHULEC F. & HARČARIK J. (2007): Genetická variabilita vybraných horských druhů cévnatých rostlin v Krkonoších. – In ŠTURSA J. & KNAPIK R. [eds.]: Geoekologické problémy Krkonoš. Sborník Mezinárodní Vědecké Konference, říjen 2006, Svoboda n. Úpou. *Opera Corcontica*, 44/1: 251-264.

JALAS J. & SUOMINEN J. (1972): Atlas Florae Europaeae: Distribution of vascular plants in Europe. – Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, USA.

KOČÍ M. (2007): Subalpínská vysokobylinná a křovinná vegetace (*Mulgedio-Aconitetea*). – In: Chytrý M. [eds.]: Vegetace České republiky 1, Travinná a keříčková vegetace. Academia, Praha.

LESKINEN E. & ALSTRÖM-RAPAPORT C. (1999): Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: evidence from 5.8 S, ITS 1 and ITS 2 of the rDNA. – *Plant systematic and evolution*. 215: 209-227.

NEWSHOLME C. (1992): Willows – the genus *Salix*. Butler & Tanner Ltd, Frome, Sommerset.

NÝVLTOVÁ V. (2009): Charakteristika skupiny vrby bobkolisté (*Salix phylicifolia* agg.) ve střední Evropě s důrazem na *Salix bicolor* v Česku. – Bakalářská práce [depon in. Katedra zoologie, PřF UP, Olomouc].

PENHALLOW D. P. (1905): A Systematic Study of the Salicaceae. – *The American Naturalist*, Vol. 39, No. 464, p. 509-535.

PÉNZES Z., CSANÁDI G., KOVÁCS M. G. & BEER Z. (2002): Molecular markers in ecology. – *Tiscia* 33, 9-30.

PLUESS A. R. & STÖCKLIN J. (2004): Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (Rosaceae) in the Swiss Alps. – *American Journal of Botany* 91(12): 2013-2021.

PROCHÁZKA F. (1989): O vrbě dvoubarvé. – *Krkonoše, Vrchlabí*, 22/6: 14-15.

PROCHÁZKA F., VAŠINA V. & CHMELÁŘ J. (1999): *Salix bicolor* Ehrh. ex Willd. – In: ČEŘOVSKÝ J., FERÁKOVÁ V., HOLUB J., MAGLOCKÝ Š & PROCHÁZKA F. [eds.]: Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR, Vol. 5, Příroda a.s., Bratislava, p. 322.

RECHINGER K. H. (1957): Genus *Salix* L. – In: HEGI G. [eds.]: Illustrierte flora von Mitteleuropa 3(1), 2. Auflage, Carl Hanser Verlag, München, p. 44-135.

RECHINGER K. H. (1964): Genus *Salix* L. – In: TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A., VALENTINE D. H., WALTERS S. M. & WEBB D. A. [eds.]: *Flora Europaea*, Volume 1 Lycopodiaceae to Plantanaceae. Cambridge University Press, Cambridge – New York, p. 43-54.

REISCH C. (2001): Climatic oscillations and fragmentation of plant populations – genetic diversity within and among populations of the glacial relict plant *Saxifraga paniculata* (Saxifragaceae) and *Sesleria albicans* (Poaceae). – Disertační práce [depon. in Přírodovědecká fakulta, Univerzita Regensburg].

REISCH C., SCHURM S. & POSCHLOD P. (2007): Spatial genetic structure and clonal diversity in an alpine population of *Salix herbacea* (Salicaceae). – *Annals of Botany* 99: 647-651.

SALICK J & PFEFFER E. (1999): The interplay of hybridization and clonal reproduction in the evolution of willows. Experiments with hybrids of *S. eriocephala* & *S. exigua* and *S. eriocephala* & *S. petiolaris*. – *Plant ecology* 141. 163-178.

SKVORTSOV A. K.(1999): Willows of Russia and adjacent countries. Taxonomic and geographic Revision. – Joensuu Univ. Press, Joensuu. 307 p.

STAMATI K., BLACKIE S., BROWN W. S. & RUSSELL J. (2003): A set of polymorphic SSR loci for subarctic willows (*Salix lanata*, *S. lapponum* and *S. herbacea*). – *Molecular Ecology Notes* 3: 208-282.

STAMATI K., HOLLINGSWORTH P. M. & RUSSELL J. (2007): Patterns of clonal diversity in three species of sub-arctic willow (*Salix lanata*, *Salix lapponum* and *Salix herbacea*). – *Plant Systematics and Evolution* 269: 75-88.

STERCK L., ROMBAUTS S., JANSSON S., STERKY F., ROUZÉ P. & DE PEER Y. V. (2005): EST data suggest that poplar is an ancient polyploid. – *New Phytologist* 167: 165-170.

STEVENS P. F. (2001): Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. – Missouri Botanical Garden.

(dostupné na <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb>, přístup 11.7. 20012)

SUDA Y. & ARGUS G. W. (1968): Chromosome numbers of some North American *Salix*. – *Brittonia* 20: 191-197.

SUCHER N. J., HENNEL J. R. & CARLES M. C. (2012): Plant DNA fingerprinting and barcoding: Methods and protocols. – *Methods in molecular biology*, vol. 862.

ŠEVČÍK J. (2012): Genetická diverzita populací vrby bylinné (*Salix herbacea* L.) ve Vysokých Sudetech. – Diplomová práce [depon in. Katedra ekologie a životního prostředí, PřF UP, Olomouc].

ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTUČEK R., RŮŽIČKOVÁ V. & KOPTÍKOVÁ J. (2005): Metody molekulární biologie. – Masarykova Univerzita, Brno, 188 pp.

ŠOUREK J. (1969): Květena Krkonoš. – Academia, Praha. 452 p.

TRIBSCH A. & SCHÖSWETTER P. (2003): Patterns of endemism and comparative phylogeography confirm paleoenvironmental evidence for Pleistocene refugia in the Eastern Alps. – *Taxon* 52: 477-497.

WATKINSON A. R. & POWELL J. C. (1993): Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations – a computer simulation of *Ranunculus repens*. – *Journal of ecology* 81: 707-717.

ZANDER M. (1996): Zur genetischen Identifizierung der *Salix bicolor* Ehrh. ex Willd. – Vorkommen vom Brocken. *Mitt. Florist. Kart. Sachsen-Anhalt*, 1: 31-37.