

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



**Využití organelární DNA pro studium genetické  
variability smrku ztepilého**

Bakalářská práce

Autor: Andrea Moravcová

Vedoucí práce: Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Andrea Moravcová

Lesnictví

Název práce

**Využití organelární DNA pro studium genetické variability smrku ztepilého**

Název anglicky

**Organellar DNA for assessment of genetic variability of Norway spruce**

---

### Cíle práce

Cílem bakalářské práce je vypracovat podrobnou literární rešerši se zaměřením na možnosti analýzy a využití informace z organelární DNA (mitochondriální a chloroplastové) pro studium genetické struktury a fylogenetického vývoje lesních dřevin se zaměřením na konkrétní druh, a to smrk ztepilý *Picea abies* (L.) H. Karst.

Součástí bakalářské práce rešeršního charakteru je také vytvoření metodiky analýzy vybraného typu organelární DNA v podmínkách molekulárně-genetické laboratoře FLD, která bude uplatněna v případě zpracování návazné diplomové práce.

### Metodika

Bakalantka provede důkladný rozbor vědecké literatury a vypracuje literární rešerši se zaměřením definovaném v cílech práce. Jako zdroje informací budou využity především impaktované vědecké články. Minimální počet zdrojů citovaných v rešerši bude 50. Dále autorka vypracuje stručný návrh metodiky analýzy organelární DNA včetně návrhu vhodných markerů.

**Doporučený rozsah práce**

40 stran

**Klíčová slova**

smrk ztepilý, mtDNA, cpDNA, genetická struktury, fylogenetický vývoj

---

**Doporučené zdroje informací**

- Achere V, Favre JM, Besnard G, Jeandroz S. (2005) Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*), *Molecular Ecology*. 14(10), pp. 3191–3201.
- Gugerli F, Sperisen C, Buchler U, Magni F, Geburek T, Jeandroz S, Senn J. (2001) Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps, *Molecular Ecology*. 10(5), pp. 1255–1263.
- Maghuly F, Nittinger F, Pinsker W, Praznik W, Fluch S. (2007) Differentiation among Austrian populations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] assayed by mitochondrial DNA markers, *Tree Genetics & Genomes*. Springer-Verlag, 3(3), pp. 199–206.
- Sperisen C, Büchler U, Mátyás G. (1998) Genetic Variation of Mitochondrial DNA Reveals Subdivision of Norway Spruce (*Picea Abies* (L.) Karst.), in *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 413–417.
- Vendramin GG, Anzidei M, Madaghiele A, Sperisen C, Bucci G. (2000) Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.), *Genome*. NRC Research Press Ottawa, Canada, 43(1), pp. 68–78.
- White TL, Adams WT, Neale DB. (2007) *Forest genetics*. CABI Publishers, Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA.
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2018/19 LS – FLD

**Vedoucí práce**

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 19. 11. 2018

**prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 2. 2019

**prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.**

Děkan

V Praze dne 12. 02. 2019

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Využití organelární DNA pro studium genetické variability smrku ztepilého“ vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 16. 4. 2019

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Koreckému, Ph.D., za velmi ochotný a vstřícný přístup, cenné rady, trpělivost a čas věnovaný při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zuzaně Bínové za pomoc s praktickou částí této práce, a především za čas, energii a svědomitost, které věnovala do našich konzultací. Děkuji také Ing. Dagmar Zádrapové a doc. Ing. Ivaně Tomáškové, Ph.D., za vstřícný přístup a pomoc. Mé velké poděkování patří též mé rodině za podporu během studia. V neposlední řadě chci poděkovat České zemědělské univerzitě v Praze, které vděčím za možnost studovat obor, který jsem si zvolila.

# Využití organelární DNA pro studium genetické variability smrku ztepilého

## Abstrakt

Bakalářská práce s názvem „Využití organelární DNA pro studium genetické variability smrku ztepilého“ je zaměřená na výzkum genetické variability u mimojaderné DNA smrku ztepilého. Jedná se o práci, která v teoretické rovině řeší problematiku využití genetické informace mimojaderné DNA pro studium genetické variability, a to včetně návrhu metodického postupu analýzy.

V rešeršní části práce byly zpracovány informace o vybraných organelách a jejich genomech, se zaměřením na chloroplasty a mitochondrie. Dále byly tyto genomy porovnány s genomem jaderným, a to především z hlediska rozdílné dědičnosti, struktury a využití se zaměřením na smrk ztepilý.

Teoretický návrh metodiky analýzy obou typů organelární DNA byl vytvořen s využitím vybraných chloroplastových a mitochondriálních markerů.

Nad rámec zadání práce bylo provedeno praktické pilotní ověření zvolené metodiky. Pro toto ověření byla vybrána metoda genetických mikrosatelitových markerů pro chloroplastovou DNA, která byla aplikována na 16 vzorcích smrku ztepilého.

**Klíčová slova:** smrk ztepilý, mtDNA, cpDNA, genetická struktura, fylogenetický vývoj

# **Organelar DNA for the assessment of genetic variability of Norway spruce**

## **Abstract**

The bachelor thesis called „Organelar DNA for the assessment of genetic variability of Norway spruce” aims at researching genetic variability in non-nuclear DNA of Norway spruce. This thesis deals with the issue of the assessment of genetic information of non-nuclear DNA for the study of genetic variability on a theoretical level including the proposal of a methodological analysis.

The theoretical part of the thesis assesses the information about the chosen organelles and their genomes, with special attention being paid to chloroplasts and mitochondria. These genomes were further compared with a nuclear genome, mainly from a point of view of different inheritance, structures and utilization, with Norway spruce always being in focus.

The theoretical proposal of the methodology of the analysis of both types of organellar DNA was based on selected chloroplast and mitochondrial markers.

In addition to the assignment, the chosen methodology was verified in a practical pilot way. The above-mentioned verification was based on the method of genetic microsatellite markers for chloroplast DNA, which was used for the analysis of 16 samples of Norway spruce.

**Keywords:** Norway spruce, mtDNA, cpDNA, genetic structure, phylogenetic development

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>15</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>16</b>
3.1 Rod smrk ( <i>Picea</i> ) .....	16
3.1.1 Smrk ztepilý ( <i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.) .....	16
3.2 Organely v rostlinných buňkách .....	19
3.2.1 Vznik a původ organel.....	19
3.2.2 Buněčné jádro .....	22
3.2.3 Mitochondrie.....	23
3.2.4 Chloroplasty.....	24
3.3 Jaderná DNA (nDNA).....	27
3.3.1 Způsob přenosu a ukládání genetické informace jaderné DNA .....	29
3.3.1.1 Replikace .....	30
3.3.1.2 Transkripce .....	31
3.3.1.3 Translace.....	31
3.4 Mimojaderná DNA.....	33
3.4.1 Mitochondriální DNA (mtDNA) .....	33
3.4.2 Chloroplastová DNA (cpDNA) .....	35
3.4.3 Rozdíly v dědičnosti mimojaderné DNA u krytosemenných, jehličnanů, tisovitých ( <i>Taxaceae</i> ) a cypřišovitých ( <i>Cupressaceae</i> ).....	36
3.5 Možnosti využití DNA pro analýzu genetické informace.....	38
3.5.1 Využití jaderné DNA .....	39
3.5.2 Využití organelární DNA.....	40
3.5.3 Fylogenetický vývoj .....	41
3.5.4 Míra variability a dědičnost .....	42
<b>4 Metodika .....</b>	<b>44</b>
4.1 Návrh metodiky pro chloroplastové markery .....	44
4.2 Návrh metodiky pro mitochondriální markery .....	47
4.3 Výběr metody analýzy organelární DNA .....	50
4.4 Lokalita a sběr vzorků.....	51
4.5 Izolace DNA.....	52
4.5.1 Příprava vzorků a homogenizace .....	52
4.5.2 Extrakce a purifikace DNA.....	52
4.6 Měření koncentrace DNA .....	55
4.7 Kontrola kvality DNA.....	56
4.8 Fragmentační analýza organelární DNA.....	59



4.8.1	Příprava vzorků DNA .....	59
4.8.2	Vytvoření multiplexu pro PCR reakci .....	59
4.8.3	PCR reakce .....	61
4.8.4	Fragmentační analýza .....	62
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>63</b>
5.1	Měření parametrů izolované DNA .....	64
5.2	Elektroforetická separace .....	65
5.3	Posouzení datového setu .....	66
5.3.1	Detekovaný polymorfismus .....	66
5.3.2	Genetická struktura a diferenciacce .....	68
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury a použitých zdrojů .....</b>	<b>74</b>

## Seznam použitých zkratek

A – adenin

ATP – adenosintrifosfát (nukleotid)

bp – páry bází (*Base pair*)

C – cytosin

cpDNA – chloroplastová DNA

Da – dalton, atomová hmotnostní jednotka

$ddH_2O$  – ultra čistá voda

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*Deoxyribonucleic acid*)

FLD – Fakulta lesnická a dřevařská

G – guanin

GTP – guanosintrifosfát (nukleotid)

IR – obrácené repetice (*Inverted repeats*)

kbp – kilo páru bází (odvozená jednotka)  $1\text{kbp}=1*10^3\text{ bp}$

LSC – velký neopakující se region (*Large single copy*)

LVS – lesní vegetační stupeň

Mbp – mega páru bází (odvozená jednotka)  $1\text{Mbp}=1*10^6\text{ bp}$

mg – miligram (odvozená jednotka)  $1\text{mg}=1*10^{-3}\text{ g}$

ml – mililitr (odvozená jednotka)  $1\text{ml}=1*10^{-3}\text{ l}$

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina (*Messenger ribonucleic acid*)

mtDNA – mitochondriální DNA

nDNA – jaderná DNA (*Nuclear DNA*)

nS – počet jednotek Svedberga (odvozená jednotka)  $1\text{S}=10^{-13}\text{ sekundy}$

PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

Rubisco (RuBisCo) – ribulosa – 1,5 – bisfosfát – karboxylasa/oxygenasa (enzym)

S-fáze – fáze buněčného cyklu mezi G<sub>1</sub> fází a G<sub>2</sub> fází

SSC – malý neopakující se region (*Small single copy*)

SSRs – mikrosatelity (*Simple sequence repeats*)

T – thymin

tRNA – transferová ribonukleová kyselina (*Transfer ribonucleic acid*)

U – uracil

μm – mikrometr (odvozená jednotka) 1 μm = 1 \* 10<sup>-6</sup> m

μl – mikrolitr (odvozená jednotka) 1 μl = 1 \* 10<sup>-6</sup> l

## Seznam obrázků

Obrázek 1 - Tři vývojové linie sinic s heterotrofním hostitelem.....	20
Obrázek 2 - Schéma virové eukaryogeneze.....	21
Obrázek 3 - Jaderné schéma .....	22
Obrázek 4 - Schématický náčrt mitochondrie .....	24
Obrázek 5 - Chloroplasty .....	25
Obrázek 6 - Struktura DNA .....	28
Obrázek 7 - Chargaffovo pravidlo .....	28
Obrázek 8 - Schéma centrálního dogmatu .....	30
Obrázek 9 - Porovnání velikostí mitochondriálních genomů u různých organismů .....	34
Obrázek 10 - Zjednodušená stavba rostlinného chloroplastového genomu .....	36
Obrázek 11 - Dendrogram vybraných druhů z čeledi <i>Pinaceae</i> .....	42
Obrázek 12 - Přírodní lesní oblasti vybraných lokalit .....	51
Obrázek 13 - Označené dvě série po osmi vzorcích izolované DNA.....	54
Obrázek 14 - Spektrální křivka čisté DNA a proteinu.....	55
Obrázek 15 - Soustava na horizontální elektroforézu.....	56
Obrázek 16 - Nanesené vzorky DNA v elektroforetické vaně .....	58
Obrázek 17 - Parametry PCR amplifikace.....	61
Obrázek 18 - Snímek vzorků na gelu po elektroforéze .....	65
Obrázek 19 - Ukázka zpracování dat (primer Pt63718) softwarem GeneMarker .....	67
Obrázek 20 - Ukázka zpracování dat (primer Pt71936) softwarem GeneMarker .....	67

## Seznam tabulek

Tabulka 1 - Taxonomické zařazení druhu ( <i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.) .....	17
Tabulka 2 - Charakteristika genomů.....	33
Tabulka 3 - Dědičnost DNA v závislosti na kmenech a čeledích.....	37
Tabulka 4 - Chloroplastové markery uvedené ve vědeckých publikacích .....	44
Tabulka 5 - Popis použitých primerů dle autorů.....	45
Tabulka 6 - Mitochondriální markery uvedené ve vědeckých publikacích.....	47
Tabulka 7 - Popis vybraných primerů dle publikací.....	48
Tabulka 8 - Označení lokalit sbíraných vzorků .....	51
Tabulka 9 - Výpočet reakce při tvorbě multiplexu .....	60
Tabulka 10 - Vytvoření programu pro průběh PCR reakce.....	62
Tabulka 11 - Změřené koncentrace a čistoty izolované DNA.....	64
Tabulka 12 - Výsledné alely podle adjustace z GeneMarkeru .....	68

## Seznam grafů

Graf 1 - Procentuální alelová frekvence na lokusu Pt63718 .....	69
Graf 2 - Procentuální alelová frekvence na lokusu Pt71936 .....	70
Graf 3 - Četnost alel na obou vybraných lokusech.....	70

# 1 Úvod

Jednotlivé znaky organismů jsou řízeny geny, jejichž soubor označujeme jako genotyp. Deoxyribonukleová kyselina neboli DNA jakožto chemická látka tvořící geny je známa již od roku 1944. Soubor veškeré genetické informace konkrétního organismu se nazývá genom. Nejznámějším genomem je jaderný, který eukaryotické organismy dědí po obou svých rodičích tzv. biparentálně. Nicméně existuje i genom mimojaderný, který je děděn uniparentálně, tedy pouze po jednom z rodičů. Tvoří ho genomy semiautonomních organel, v případě eukaryotických buněk jsou to mitochondrie, a u rostlin ještě navíc plastidy. Tyto genomy neboli plazmony řídí nebo jsou spoluřízeny informacemi, jejichž zdroj nepochází z jádra buňky, nýbrž z mitochondrií (chondriogeny) a plastidů (plastogeny) (Jelínek & Zicháček, 2014).

Mimojaderná DNA je užitečná jako zdroj haploidních genetických markerů za účelem studie populační genetiky a biogeografie (Jaramillo-Correa et al., 2003). V mnoha studiích byla tato DNA použita pro rozluštění populační struktury, migračních cest, fylogeneze, systémů páření a reprodukčního chování (Lunt, Whipple, & Hyman, 1998; Palmer et al., 2000).

V této práci bylo zkoumáno využití mimojaderné DNA a dále studium její genetické variability u smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.).

Smrk ztepilý je jedna z nejvýznamnějších hospodářských dřevin, jejíž rozšíření sahá od Sibíře po severní Evropu. Také proto jsou znalosti o existující genetické variabilitě a populační diferenciaci nápomocné pro různé aspekty managementu genetických zdrojů (Maghuly et al., 2008).

Zejména v posledních dvou staletích byl smrk ztepilý ve střední Evropě vysazován uměle (Schubert, Mueller-Starck, & Riegel, 2001). Brzy nahradil původní zastoupení dřevin a začal dominovat. Díky pozměněné druhové skladbě porostů na území České republiky je velká část lesních porostů geneticky nepůvodní. Vývoj přirozené populace smrku je závislý na své genetické diverzitě, proto platí, že se populace lépe přizpůsobí změnám podmínek na daném stanovišti, pokud jsou populace geneticky rozmanitější.

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem práce je vypracovat širší tematikou řešerši se zaměřením na možnosti analýzy a využití informací z organelární DNA pro studium genetické variability a fylogenetického vývoje lesních dřevin se zaměřením na smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.).

Součástí práce je metodický návrh využití dostupných organelárních markerů pro analýzu genetické variability. Tento cíl práce byl řešen především na základě rozboru vědecké literatury v řešerši. Jedná se o metodiku analýzy vybraného typu organelární DNA v podmínkách molekulárně-genetické laboratoře FLD, která by mohla být v budoucnu reálně aplikována.

Nad rámec zadání bakalářské práce byla provedena pilotní studie analýzy chloroplastové DNA metodou mikrosatelitových markerů. Tato část bakalářské práce slouží jako ověření a ilustrace funkčnosti metodiky navržené v teoretické rovině.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Rod smrk (*Picea*)

Rod smrk (*Picea*) je přirozeně rozšířený pouze na severní polokouli a lze ho rozčlenit do 48 různých druhů (Obidowicz et al., 2004). Je dobře morfologicky ohraničený oproti ostatním druhům, avšak uvnitř rodu je vysoká proměnlivost morfologických znaků, což ztěžuje vylišení a určování jednotlivých druhů. Tento rod se dělí dle šišek a jehlic do dvou podrodů a čtyř sekcí. Hojnější podrod *Picea* se skupinou šišek typu *morinda*, kam patří také smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.), má tužší méně ohebné tmavě hnědé semenné šupiny. Méně častý podrod *Casieta* se skupinou šišek typu *casieta* má naopak semenné šupiny méně tuhé až ohebné, tenké a světle hnědé např. *Picea sitchensis* (Carrière 1855) Z hlediska vývoje má rod *Picea* výhodu ve schopnosti tvořit mutanty, jež umožňují taxonu lepší adaptace za určitých extrémních podmínek (Musil & Hámerník, 2003).

#### 3.1.1 Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.)

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.) je nejpolymorfnějším taxonem z rodu *Picea*. To se týká jak interpopulační, tak intrapopulační variability. U smrku je možno pozorovat i širokou morfologickou variabilitu, hlavně u tvaru koruny, šišek, větvení atd. (Musil & Hámerník, 2003).

Zařazení smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.) a dalších dřevin stejného rodu dle biologické systematiky je vyobrazeno v tabulce 1. Latinský název smrku ztepilého vymyslel německý botanik a geolog Gustav Karl Wilhelm Hermann Karsten, který mimo jiné působil i jako taxonom a autor mnoha binomických vědeckých názvů botanických druhů.



Tabulka 1 - Taxonomické zařazení druhu (*Picea abies* (L.) H. Karst.)

Základní taxonomické kategorie		
Taxony	Latinský název	Český název
Říše	<i>Plantae</i>	Rostliny
Kmen	<i>Gymnospermae</i>	Nahosemenné
Oddělení	<i>Pinophyta</i>	Jehličnany
Třída	<i>Pinopsida</i>	Jehličnaté
Řád	<i>Pinales</i>	Borovicotvaré
Čeleď	<i>Pinaceae</i>	Borovicovité
Rod	<i>Picea</i>	Smrk
Druh	<i>P. abies</i>	Smrk ztepilý

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.) je druh boreálních hor, ale je vysoce variabilní, co se týká podmínek a habitatu jeho výskytu. Přirozeně se vyskytuje v horských lesích. Lze ho také najít jako příměs na chladnějších podmáčených lokalitách, luzích, roklinách, stinných údolích a okrajích rašelinišť, z čehož je patrné, že ačkoliv je to druh stínomilný, v mládí snese zástin (Musil & Hámerník, 2003). Dosahuje věku mezi 300–400 lety maximálně se však dožívá 600 let.

Ekotyp je daná populace s určitou genetickou strukturou, kterou dlouhodobě utvářelo prostředí. Z ekologického a ekonomického hlediska je důležité zachovat genofond původních ekotypů adaptovaných na dané přírodní podmínky (Cvrčková, Máchová, Dostál, & Malá, 2011).

V České republice jsou rozlišovány tři hlavní klimatické ekotypy smrku ztepilého. Jedná se o vysokohorský ekotyp formy *obovata* (8. LVS), horský ekotyp formy *europaea* (5.–6. LVS) a chlumní ekotyp formy *acuminata* (1.–4. LVS). Sedmý lesní vegetační stupeň je přechodem mezi vysokohorským a horským ekotypem, často je nazýván lokálním ekotypem (Jurásek, Leugner, & Martincová, 2007). Jednotlivé ekotypy nejsou jasně vymezené, co se týká areálů jejich výskytu či morfologických znaků, takže se často vzájemně prolínají.

Smrkové dříví jako produkt lesního hospodářství má širokou škálu využití. Zpracovává se na řezivo, papír (vlákninu), stavební, truhlářské a nástrojářské dříví. Nejvyšší kvalita smrkového dříví se používá jako rezonanční dříví na výrobu hudebních nástrojů (Slávik, 2004). I proto je smrk nejdůležitější hospodářská dřevina střední a severní Evropy.

Smrk ztepilý zabírá 50,3 % plochy porostní půdy v České republice (Ministerstvo zemědělství, 2018). Nicméně v současné době většina smrkových porostů na území České republiky trpí suchem. Následně je napadena kalamitními hmyzími škůdci, a to zejména *Ips typographus* (Linnaeus, 1758), *Ips amitinus* (Eichhoff, 1871) a *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus, 1761). V roce 2017 bylo v České republice evidováno 5,34 mil. m<sup>3</sup> smrkového kůrovcového dříví, což je oproti roku 2016 nárůst o 25 % (Ministerstvo zemědělství, 2018). Tato čísla nejsou konečná a stále rostou, celkové napadení smrku je podle (Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, 2018) odhadnuto až na 20 mil. m<sup>3</sup>.

## 3.2 Organely v rostlinných buňkách

Rostlinné buňky jsou známy jako buňky eukaryotické, které na rozdíl od buněk prokaryotických mají větší a mají složitější strukturu, která je tvořena množstvím biomembránových organel a strukturovaným jádrem s jadernými chromozomy (Jelínek & Zicháček, 2014).

Eukaryotické buňky dokážou fungovat jako samostatné např. u prvoků, nebo jako soubory buněk. U rostlin jsou tak známy jako pletiva, u živočichů jako tkáň či u hub jako hyfy. Protože je tato práce zaměřena na smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.), bude pojednávat o buňkách rostlinných a jejich organelách.

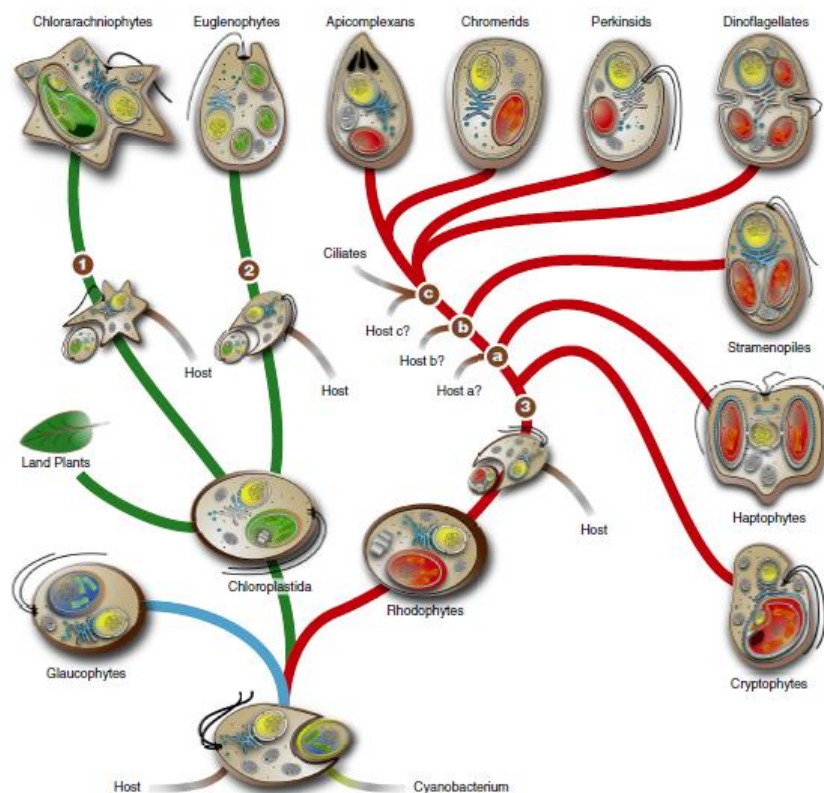
Rostliny jsou mnohobuněčné organismy složené z miliónů buněk se specifickými funkcemi. Struktura jednotlivých specializovaných buněk může být v generativní fázi vývoje navzájem odlišná, přesto všechny rostliny mají stejnou základní eukaryotickou buněčnou organizaci: obsahují jádro, cytoplazmu, subcelulární organely a jsou uzavřeny v membráně, která ohraničuje jejich tvar (Taiz & Zeiger, 2015).

### 3.2.1 Vznik a původ organel

Semiautonómni organely, jako jsou mitochondrie nebo plastidy, mají jinou genetickou informaci než buněčné jádro. Existuje teorie o původu těchto organel, která byla zpopularizována zejména v 70. a 80. letech 20. století americkou bioložkou Lynn Margulisovou (Sapp, 2003). Teorie v podstatě tvrdí, že mitochondrie a plastidy byly dříve samostatně žijícími prokaryoty, jež se pak staly organelami eukaryotických buněk (Zimorski, Ku, Martin, & Gould, 2014). Došlo k tzv. endosymbióze. Hlavní silou této teorie je podobnost mezi fyziologií a biochemií organel a prokaryotických buněk (John & Whatley, 1975). Genomy těchto organel v sobě mají zachovaný prokaryotický chromozom, který kóduje 200 a méně proteinů u plastidů (Glöckner, Rosenthal, & Valentin, 2000), nebo 63 a méně proteinů u mitochondrií (Burger, Gray, Forget, & Lang, 2013). I přes genomovou redukci každá z organel přechovává, ale nekóduje 2000 proteinů, které jsou zapojeny do širokého spektra drah vztahujících se k jejich zděděné prokaryotické biochemii (Kleine, Maier, & Leister, 2009). To, jak se liší počty proteinů, jež kódují organely a počty proteinů, jež je v sobě pouze přechovávají je obecně vysvětleno endosymbiotickým genovým transferem nebo jako důsledek endosymbiotické teorie zahrnující genový přenos k jádru. Při evolučním

vývoji přešlo mnoho genů z organel do chromozomů hostitele. Před vznikem zařízení pro import proteinů se přenesené geny také staly pseudogeny nebo se staly součástí cytosolu (Zimorski et al., 2014).

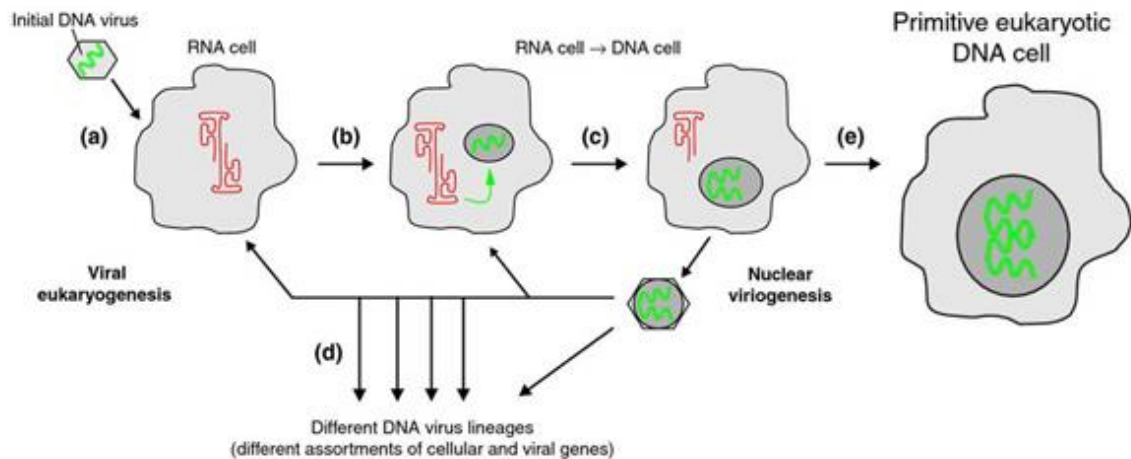
V 70. letech 20. století se diskutovalo o dalších teoriích vysvětlujících původ organel. Některé podporovaly spíše autogenní teorii o původu organel na rozdíl od symbiotické. Původ plastidů a mitochondrií byl chápán jako důsledek invaginace (vchlipování) plazmatické membrány (Bogorad, 1975), nebo restrukturalizace tylakoidů v sinicích (Cavalier-Smith, 1975). Předpověď, že genová sekvence DNA v organelách je více podobná sekvenci genů z jaderné DNA než genům ze samostatně žijících prokaryot, mohla být testována porovnáním sekvencí DNA. V 80. let 20. století byla endogenní teorie vyloučena pomocí 16S rRNA analýzy, která potvrdila, že plastidy mají původ v předcích sinic (*Cyanobacteria*) – aerobní fotoautotrofní bakterie (Giovannoni et al., 1988) a také se povedlo dohledat původ mitochondrií až k proteobakteriím (*Proteobacteria*) – aerobním heterotrofním bakteriím (Yang, Oyaizu, Oyaizu, Olsen, & Woese, 1985). Obrázek 1 ilustruje 3 vývojové linie sinic s heterotrofním hostitelem.



**Obrázek 1 - Tři vývojové linie sinic s heterotrofním hostitelem: Glaukofyty, Zelené rostliny a Ruduchy (Zimorski et al., 2014)**

Vznik a původ pravého jádra u eukaryot je stále zahalen tajemstvím, ačkoliv existuje řada hypotéz. Například podle syntrofické hypotézy vzniklo jádro tak, že došlo ke splynutí bakterie a archeální bakterie, načež se archeální cytoplazmatická membrána stala jadernou membránou nové buňky a původní cytoplazmatická membrána má představovat dnešní buněčnou stěnu eukaryot (Moreira & López-García, 1998).

Další teorií je, že jádro vzniklo virovou eukaryogenezí, kdy byl virus fagocytován do buňky (Livingstone Bell, 2001), tato teorie se opírá o fakt, že viry a jádra eukaryot vykazují některé podobné rysy např. jejich DNA tvořena je lineárními řetězci. Schéma virové eukaryogeneze dokladuje obrázek 2.



Obrázek 2 - Schéma virové eukaryogeneze (Rhawn, 2009)

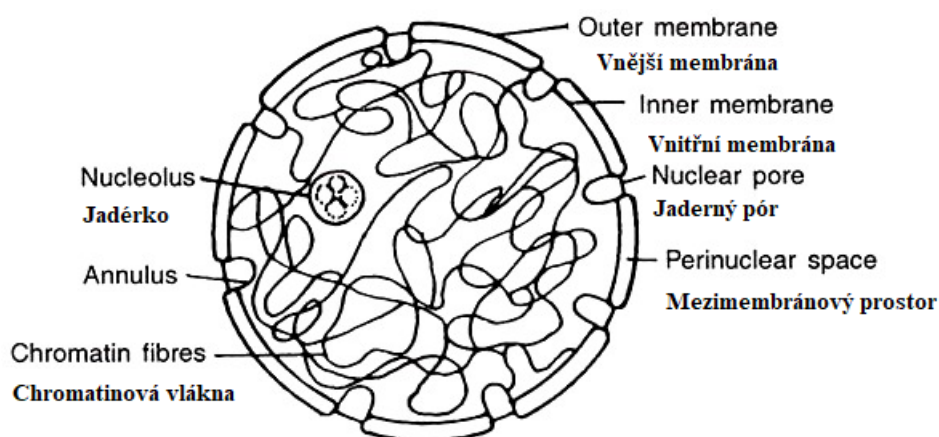
Jednou z mladších teorií je tzv. exomembránová hypotéza. Ta tvrdí, že se jádro vyvinulo z buňky, která byla vybavena 2 vnějšími cytoplazmatickými membránami, a tak se z vnitřní membrány mohla stát jaderná membrána. Na této membráně vznikly pórovité komplexy. Z vnější membrány se stala vnitřní membrána (de Roos, 2006).

Dodnes není žádná z teorií o vzniku a původu pravého jádra jednoznačně přijata vědeckou obcí.

### 3.2.2 Buněčné jádro

Jádro (*nucleus*, *karyon*) v eukaryotické buňce může mít různou velikost i tvar, většinou je tvarem přizpůsobené tvaru buňky a velikostí od 5 do 10  $\mu\text{m}$  (Jelínek et al., 2007). Je to membránová organela skládající se na povrchu z dvojité pórovité biomembrány, která ohraničuje vláknité chromozomy s karyoplazmou a jadérka (*nucleolus*) od okolní cytoplazmy (Jelínek & Zicháček, 2014). Některé specializované buňky s omezenou životností jádro vůbec nemají např. červené krvinky. Jiné buňky zase mohou mít jader více, což je typické pro prvoky. Jadérek je v jádru vždy jedno a více. Ty obsahují rRNA, která je v jadérku transkribována, zapojena do ribozomů a dále putuje jadernými póry do cytoplazmy. Na obrázku 3 je zobrazeno jaderné schéma.

Chromozomy v jádře nesou genetickou informaci o buňce ve formě DNA. Počet chromozomů v jádře je druhově specifický. Liší se i podle ploidie daného druhu. Vyšší rostliny mají většinou diploidní  $2n$ , triploidní  $3n$  až hexaploidní  $6n$  počet chromozomů. Pro nahosemenné rostliny je typický spíše diploidní počet chromozomů, polyploidních jich je méně než 5 % (Suda, 2009). Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.) má ve svém jádře 24 párů homologních chromozomů, je tedy diploidní (Eriksson, Ekberg, & Clapham, 2006). Díky tomu, že je v jádru uchována genetická informace buňky, je jádro důležité pro rozmnožování a také pro exprese genetické informace (Tomášková & Kubásek, 2016).



Obrázek 3 - Jaderné schéma, modifikováno, <https://rbpaonline.com/flow-chart-of-cell-organelles/cell-organelles-types-diagram-2/>, 11. 11. 2018

### 3.2.3 Mitochondrie

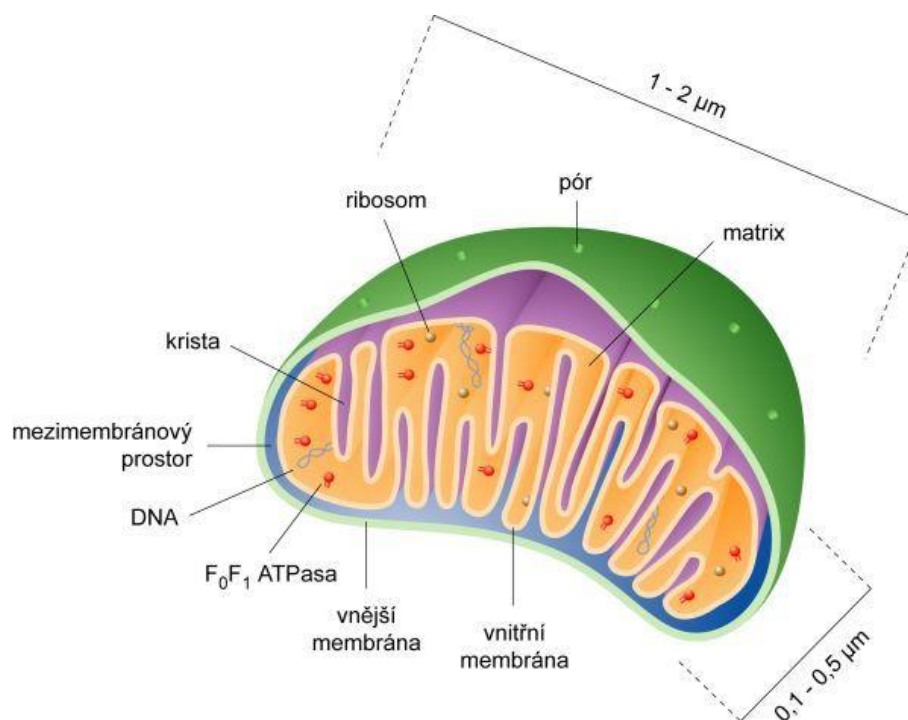
Mitochondrie jsou semiautonomní organely neboli organely s vlastní genetickou informací. Svou stavbou a velikostí cca 1-3  $\mu\text{m}$  připomínají prokaryotickou buňku. Jejich počet je od několika stovek až po několik tisíc na jednu buňku (Tomášková & Kubásek, 2016).

Název mitochondrie pochází ze staré řečtiny a v překladu by znamenal pravděpodobně vláknité zrno, protože se nejdříve předpokládalo, že mitochondrie mají tvar zrn, nicméně v 19. století se ukázalo, že mohou být i vláknité struktury (Scheffler, 1999).

Stavba mitochondrie je poměrně jednoduchá, ale zato variabilní. Skládá se z dvou membrán – vnitřní a vnější. Vnější hladká membrána je pórovitá a tím i propustná pro malé molekuly. Membrána vnitřní je prokaryotického typu, zprohýbaná do záhybů, zvaných krysty. Funkce vnější membrány je hlavně separace vnitřního prostředí organely od okolní buňky. Stavbou se podobá endoplazmatickému retikulu, ale je poměrně pórovitá, ačkoliv póry jsou propustné pro látky do molekulové hmotnosti 5000 Da (Lennarz & Lane, 2013). To znamená, že se skrz póry nedostanou bílkoviny a makromolekuly, a zároveň ven neprojdou proteiny dýchacího řetězce. Aby mohlo dojít k transportu proteinů, obsahuje vnější membrána tzv. Tom komplex, enzym, který dokáže přenášet proteiny z cytoplazmy do prostoru mezi membránami.

Vnitřní membrána je, jak už bylo výše uvedeno, tvořena záhyby zvanými krysty. Bez vnitřní membrány by mitochondrie nefungovala. Je tvořena speciální fosfolipidovou dvojvrstvou s fosfolipidem kardiolipinem, který má ve své fosfátové hlavě čtyři mastné kyseliny (pro klasickou fosfolipidovou dvojvrstvu jsou typické 2 mastné kyseliny) (Vaidya, 2014). Tato stavba membrány má pravděpodobně vliv na velmi selektivní propouštění molekul. Na této membráně se nachází enzymy dýchacího řetězce. Stejně jako má vnější membrána Tom komplex, vnitřní membrána má tzv. Tim komplex na přenášení proteinů (Lennarz & Lane, 2013).

Vnitřnímu mitochondriálnímu prostoru se říká matrix. Jde v podstatě o hustou hmotu, která obsahuje méně než 50 % vody (Voet, Kotyk, Geis, Pecák, & Voet, 1995). Matrix je bohatá na bílkoviny, enzymy, nukleotidové koenzymy, ionty vápníku, mitochondriální DNA, RNA, mitochondriální ribozomy. Schématický náčrt mitochondrie a jejich částí ilustruje obrázek 4.



**Obrázek 4 - Schématický nákres mitochondrie, <https://protiunave.cz/mitochondrie-neni-nadavka/>, 19. 11. 2018**

Na povrchu vnitřní membrány a uvnitř probíhají důležité metabolické pochody: Krebsův cyklus, dýchací řetězec, beta-oxidace mastných kyselin. To, ale zdaleka není vše, mitochondrie se totiž podílejí například na kontrole buněčného cyklu, buněčné smrti a na buněčné diferenciaci (McBride, Neuspiel, & Wasiak, 2006). Obecně jsou mitochondrie považovány za továrny pro výrobu energie v buňce.

Mitochondrie se pohybují uvnitř rostlinných buněk pasivními nebo i aktivními pohyby spolu s cytoplazmou (Douce, 1985).

Vznik mitochondrií je proces, jenž připomíná binární dělení bakterií, avšak mitochondrie umí i opačný proces a to fúzi dohromady (Alberts et al., 2014). Dochází k replikaci mtDNA a následnému dělení organel.

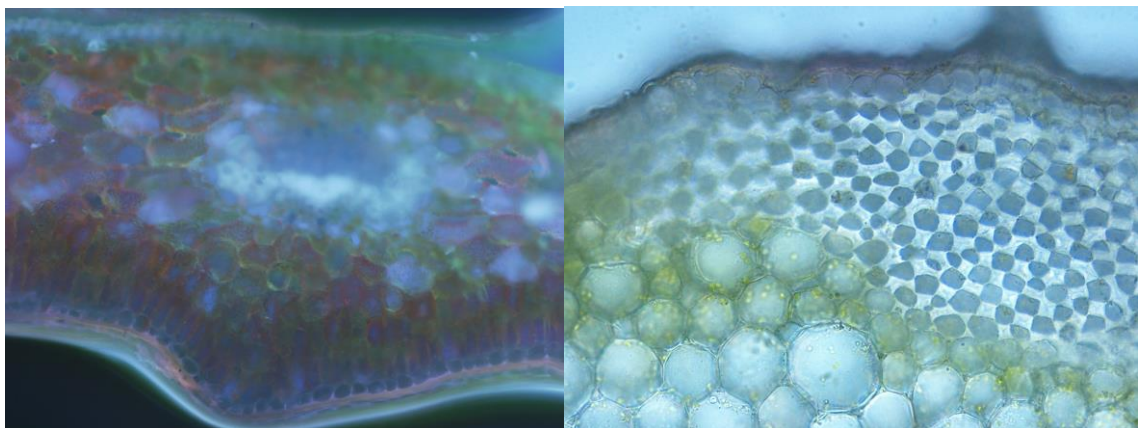
### 3.2.4 Chloroplasty

Chloroplasty jsou plastidy, které v sobě obsahují zelené fotosynteticky aktivní barvivo chlorofyl, díky němuž mají svůj název. Jedná se o semiautonomní organely nacházející se ve většině rostlinných eukaryotických buněk. Rozložení chloroplastů v buňkách listů je nerovnoměrné a neustálé, čímž je zajištěno maximální využití světla rostlinou při fotosyntéze (Tomášková & Kubásek, 2016). Ačkoliv jsou tvarem



a velikostí velmi rozmanité, nejčastěji nabývají tvaru elipsoidu o velikosti cca 5  $\mu\text{m}$  (Voet et al., 1995). U vyšších rostlin jich v každé buňce bývá v průměru kolem čtyřiceti (Kincl, Kincl, & Jakrlová, 2006).

Stavba chloroplastu je podobná mitochondriální stavbě. Vnější membrána je díky porinům (integrální proteiny) značně propustná pro většinu menších molekul. Svůj genetický původ má v membránách rostlinné buňky, díky podobnému složení, je totiž tvořena lipidy a proteiny. Vnitřní membrána je plná proteinových komplexů (přenašečů) a kanálů. Složením se podobá membránám bakterií, což mimo jiné odkazuje na endosymbiotickou teorii. Vnitřek chloroplastu je naplněn stromatem, bezbarvou tekutinou, ve které se nachází mimo jiné: cpDNA, chloroplastové ribozomy a enzymy jako například Rubisco atd. Stroma obtéká membránové váčky zvané tylakoidy, které jsou často uskupené do sloupců zvaných grana (Campbell, Williamson, & Heyden, 2006). Pak se nazývají granální tylakoidy. Pokud jsou uskupené samostatně či do lamel propojujících jednotlivá grana, nazýváme je stromální tylakoidy. Prostor uvnitř tylakoidů se označuje jako lumen. Obrázek 5 ilustruje chloroplasty dvou eukaryot zachycené mikroskopem. Vnitřní membrána tylakoidů má na sobě ATP syntázy, fotosystémy a elektronové přenosové řetězce, takže se na ní odehrávají transportní děje (Tomášková & Kubásek, 2016).



**Obrázek 5 - Chloroplasty: Vlevo příčný řez jehlicí tisu, vpravo příčný řez stonkem kopřivy, (doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.)**

Funkce chloroplastů je velmi rozsáhlá. V tylakoidní membráně probíhá světelná fáze fotosyntézy (primární fáze) tzn. procesy od elektronového přenosu až po syntézu ATP. Sekundární fáze probíhá také v chloroplastech, ale tentokrát ve stromatu. Stěžejní proces temností (sekundární) fáze fotosyntézy, při kterém se fixuje a redukuje

anorganický oxid uhličitý, se nazývá Calvin-Benson-Basshamův cyklus (Taiz & Zeiger, 2015).

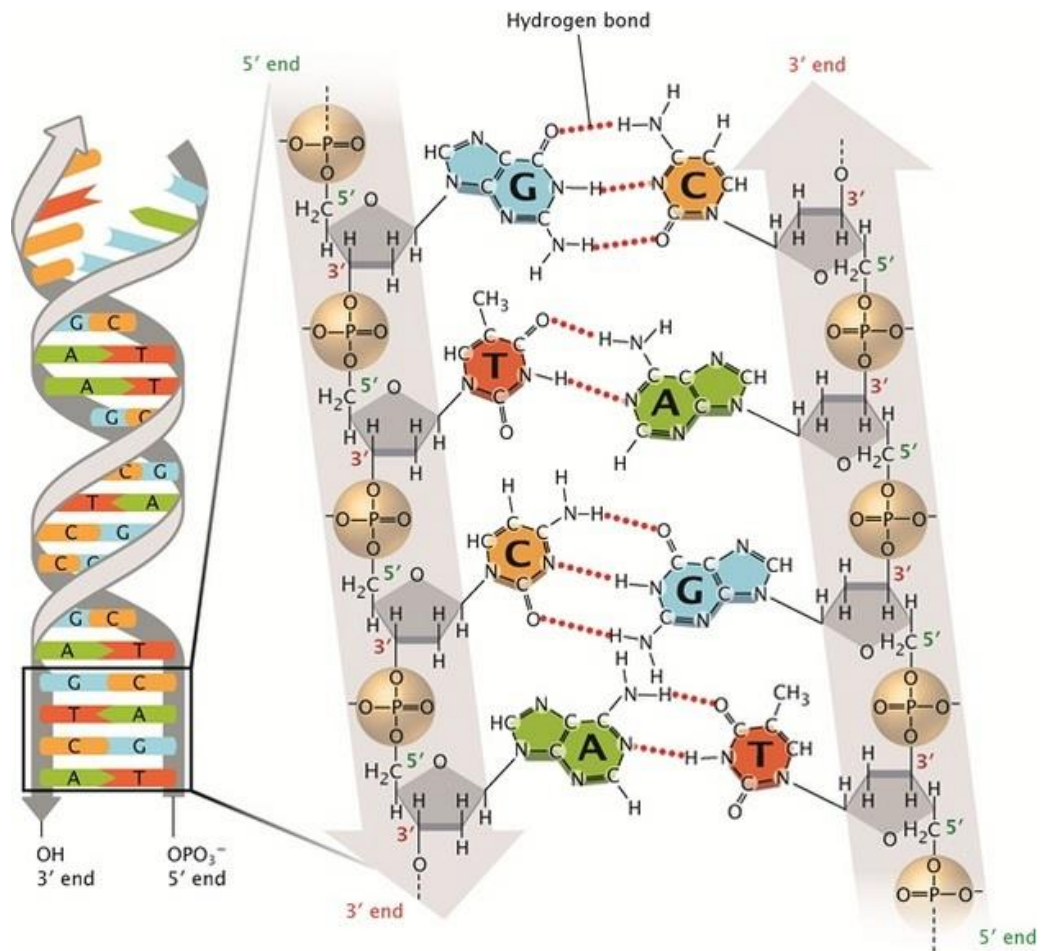
Zjednodušeně řečeno chloroplasty jsou orgány, které udržují na Zemi život tím, že poskytují potravu, energii a kyslík procesem fotosyntézy. Zároveň byl jejich genom navržen tak inteligentně, že je schopen předávat cenné agronomické znaky, nebo posloužit jako bioreaktor pro výrobu průmyslových enzymů, biofarmatik, bioproduktů nebo vakcín (Jin & Daniell, 2015).

### 3.3 Jaderná DNA (nDNA)

Z chemického hlediska je jaderná DNA lineární molekula tvořená čtyřmi typy nukleových bází neboli nukleotidů (A= adenin, T= thymin, G= guanin, C= cytosin), které jsou navázány kovalentní N-glykosidickou vazbou na deoxyribózy, konkrétně na uhlík v pozici 1'. Deoxyribózy mají na svých atomech uhlíku v pozici 3' a 5' navázanou fosfodiesterovou vazbou fosfátové skupiny (Kočárek, 2008).

Pro jadernou DNA je typický její tvar pravotočivé dvoušroubovice, která je tvořena ze dvou komplementárních polymerních řetězců. Tento převratný objev učinili v roce 1953 Brit Francis Crick, Američan James Watson a Angličan Maurice Wilkins, kteří byli za svůj vědecký přínos v roce 1962 oceněni Nobelovou cenou. Jejich objev byl možný zejména díky datům od Angličanky Rosalind Franklinové, která se zabývala rentgenovou krystalografií.

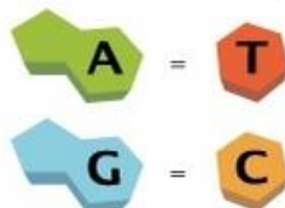
Řetězce jsou mezi sebou spojeny přes nukleotidy vodíkovými vazbami (Watson, 1966). A to konkrétně tak, že mezi adeninem a thyminem je vazba dvojitá a mezi cytosinem a guaninem pevnější vazba trojitá. Teplota potřebná k denuraci DNA je kolem 90–100 °C, avšak rozrušit vodíkové vazby lze i pomocí některých chemických sloučenin nebo specifických enzymů (Kočárek, 2008). Struktura jaderné DNA je ilustrována obrázkem 6.



Obrázek 6 - Struktura DNA, Nature Education 2013

Biochemik Erwin Chargaff zavedl pravidlo, které říká, že ve dvoušroubovici DNA je vždy stejný počet purinových a pyrimidinových bází. Přičemž se množství adeninu vždy rovná množství thyminu ( $A = T$ ) a množství guaninu je vždy rovno množství cytosinu ( $G = C$ ) viz obrázek 7.

Total Purines = Total Pyrimidines



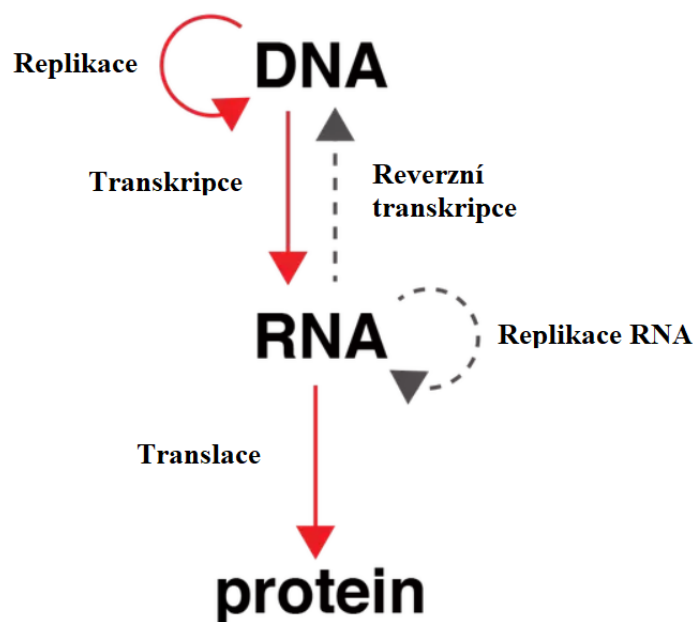
Obrázek 7 - Chargaffovo pravidlo, Nature Education 2013

DNA nese genetickou informaci daného organismu. Její primární struktura (pořadí nukleotidů) je významná pro přenos genetické informace (Jelínek & Zicháček, 2014). Podle Mendelovy definice je gen jednotka dědičnosti, která se nachází na určitém místě (lokusu) na chromozomu (Koolman & Röhm, 2012). Geny mohou být jak kódující oblasti – exony, tak nekódující oblasti – introny. Souborem genů buňky či organismu se rozumí genotyp. Různé formy genů na lokusech jsou nazývány alelami, které vyjadřují fenotypové rozdíly mezi jedinci. Alely se mohou vyskytovat například v diploidních organismech ve dvojicích, kde mohou být dominantní nebo recesivní. Podle jejich kombinace se dá určit výsledný fenotyp neboli vnější projev genotypu. Pokud má jedinec ve svém genotypu pár shodných alel (dominantní a dominantní, recesivní a recesivní), jedná se o homozygota. Pokud má jedinec naopak v genotypu pár odlišných alel (dominantní a recesivní) jedná se o heterozygota (Kočárek, 2008).

Eukaryotické genomy jsou zpravidla větší než prokaryotické, které se velmi podobají mimojaderným genomům eukaryot. Dále jsou rozdíly i v počtu typů přítomných DNA polymeráz, přičemž u eukaryot jich bylo nalezeno nejméně 15 (Tuusa, 2001).

### **3.3.1 Způsob přenosu a ukládání genetické informace jaderné DNA**

Informační tok při expresi dědičné informace je popisován centrálním dogmatem molekulární biologie. Schéma tohoto dogmatu ilustruje obrázek 8. Jde vlastně o proces, jak se z DNA stane protein či jiný genetický produkt. Základním aspektem tohoto procesu je genetický kód, kde každý triplet nukleotidových bází (kodon) kóduje jednu aminokyselinu (White, Adams, & Neale, 2007). Je známo, že u eukaryotních organismů existuje 20 proteogenních aminokyselin, kde rozlišujeme 4 nukleotidy (A, G, C a U, resp. T). Jelikož je třeba nadefinovat 20 aminokyselin, skládají se kodóny ze 3 po sobě jdoucích bází (triplety), což dá  $4^3=64$  kodonů (Koolman & Röhm, 2012). Genetický kód je degenerovaný, protože pro většinu aminokyselin existuje více stejných kodonů.



Obrázek 8 - Schéma centrálního dogmatu, modifikováno,  
<https://www.quora.com/What-is-the-central-dogma-of-molecular-biology-Is-it-true>, 6. 4. 2019

### 3.3.1.1 Replikace

Replikace neboli samozdvojení je děj, který se odehrává v rámci buněčného cyklu při mitóze. Účelem je, aby se při buněčném dělení předala dědičná informace uložená v jádře do všech dceřiných buněk (Koolman & Röhm, 2012).

Iniciační fáze replikace začíná v iniciačních počátcích na vláknech DNA, od kterých pokračuje v obou směrech. Eukaryotické organismy mají většinou více těchto počátků v závislosti na velikosti genomu. Enzym helikáza rozruší vodíkové vazby mezi jednotlivými nukleotidy, čímž rozvolní polynukleotidové řetězce od sebe a ty pak fungují jako vzory (matrice, templát) pro přiřazení volných nukleotidů, které jsou komplementární k řetězci (Jelínek & Zicháček, 2014).

Aby mohla započít elongační fáze a syntéza nového vlákna, je potřeba primeru, což je krátká molekula RNA dlouhá 10-200 nukleotidů (Vella, 1988). U replikace DNA tento primer nazýváme primáza, umožňuje, aby DNA polymeráza nasedla na vlákno a započala syntézu nového vlákna. Avšak DNA polymeráza dokáže syntetizovat pouze jednosměrně od 5' k 3' konci na vedoucím vlákně. Druhé opožděné antiparalelní vlákno začínající koncem 3' k 5' je replikováno DNA polymerázou po částech tzv. Okazakiho fragmentech. K tomu je potřeba na začátku každého Okazakiho fragmentu nový RNA primer, od kterého může DNA polymeráza začít replikovat. Primery jsou poté

vystřiženy a fragmenty jsou spojeny dohromady DNA ligázou, čímž dojde ke vzniku souvislého vlákna.

V terminační fázi je kompletně dokončena replikace molekuly DNA. Fyziologický princip replikace DNA v živých soustavách byl přenesen do podmínek *in vitro* a je využíván v molekulární biologii a genetice. Jedním z příkladů může být polymerázová řetězová reakce neboli PCR, která je metodicky využívána také v této bakalářské práci.

### 3.3.1.2 Transkripce

Transkripce probíhá v jádře buňky, kde dochází k přenosu genetické informace přepisem z DNA na mRNA. Enzym helikáza naruší vodíkové vazby mezi bázemi protilehlých nukleotidů a dojde k dočasnému rozestupu vláken od sebe. Jedno vlákno DNA slouží jako templát pro syntézu mRNA pomocí enzymu RNA polymerázy. U transkripce není zapotřebí pro iniciaci primer. Při této syntéze stejně jako u replikace funguje komplementarita bází, akorát v genetickém kódu mRNA není nukleotid tymin, nýbrž je místo něj uracil. Následně dochází ještě k řadě úprav, jako je odstranění intronů nebo RNA spojování. Poté se mRNA přesune mimo jádro do cytoplazmy a dále na ribozomy, kde dojde k translaci.

### 3.3.1.3 Translace

Translace je překlad mRNA do sekvence aminokyselin proteinu. Děj probíhá na ribozomech za účasti mnoha enzymů, tRNA a mRNA. Ribozom je tvořen dvěma podjednotkami 40S a 60S, které se obě nachází v cytoplazmě.

Podjednotka 40S váže tRNA s GTP a tzv. ternárním komplexem (multisubstrátový enzym) a čeká na mRNA, kterou díky ternárnímu komplexu dokáže rozpoznat a dopravit k sobě. Podjednotka 40S skenuje ve směru od 5' k 3' konci mRNA až do iniciačního kodónu, v tom okamžiku dojde ke změně, kdy ternární komplex s tRNA a s komplementární sekvencí (UAC) se naváže k iniciačnímu kodónu (AUG) a dojde k přenesení první aminokyseliny do bílkoviny (Tomášková & Kubásek, 2017).

Velká podjednotka ribozomu 60S nasedá na malou podjednotku 40S poté, co GTP odštěpí jeden fosfát a tím předá energii pro vytvoření peptidové vazby. Tím vznikne

kompletní proteosyntézy schopný ribozom 80S. Dále příslušné tRNA přináší aminokyseliny a ty se po vzoru počáteční aminokyseliny zapojují za sebe peptidovými vazbami. To probíhá do dosažení jednoho z terminačních kodónů, který tento proces zastaví. Díky uvolňovacím faktorům a GTP se bílkovina oddělí od ribozomu, stejně jako jeho obě podjednotky.



### 3.4 Mimojaderná DNA

Mitochondriální a chloroplastová DNA rostlin je obecně děděna po jednom rodiči, na rozdíl od jaderného genomu (Mejnartowicz, 1991; Neale, Marshall, & Sederoff, 1989; Neale & Sederoff, 1989; White et al., 2007). Při generativním rozmnožování dochází k předání haploidního jádra samčí pohlavní buňky, přičemž mitochondrie a chloroplasty v samčích gametách chybí či jsou degradovány po vstupu vajíčka. Proto nový jedinec získává mimojaderné genomy většinou po matce. Tyto geny se přenáší na veškeré potomstvo (Kočárek, 2008). Avšak podle Kormutaka a kol. (2018) může při recipročním křížení *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* docházet k biparentální dědičnosti chloroplastové DNA, což ukazuje na uvolnění kontroly maternální dědičnosti cpDNA v domnělých hybridech.

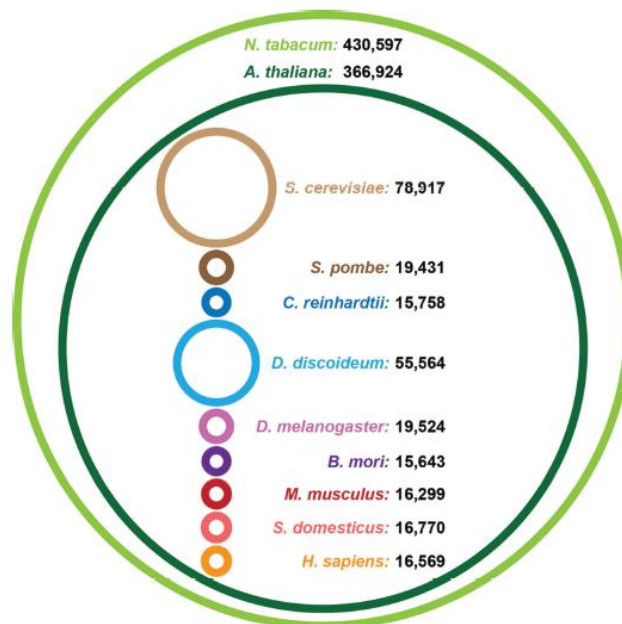
#### 3.4.1 Mitochondriální DNA (mtDNA)

Mitochondriální živočišná DNA není lineární molekula jako DNA jaderná, ale jedná se o molekulu kruhovou. Často je její podoba přirovnávána k prokaryotnímu genomu, protože se jedná o cirkulární chromozom bez intronů, s dalšími podobnými vlastnostmi. Kruhové molekuly jsou díky absenci volných konců odolnější vůči mutacím a poškození. Nicméně molekuly rostlinného mitochondriálního genomu nebyly prokázány vždy jako cirkulární molekuly, místo toho existují spíše ve formě skupin jako lineární části nebo menší cirkulární molekuly (tabulka 2) (Nielsen & Stewart, 2016).

Tabulka 2 - Charakteristika genomů, (Lowe, Harris, & Ashton, 2004)

Genom	Dědičnost	Struktura	Strukturní mutace	Rekombinace
nDNA	biparentální	lineární	běžné	ano
cpDNA	<u>krytosemenné:</u> maternální	<u>jehličnany:</u> paternální	cirkulární	vzácné
mtDNA	maternální	cirkulární, komplexní	běžné	intramolekulární a intermolekulární

Jelikož mitochondrie je zodpovědná za buněčné dýchání, mtDNA geny kódují proteiny respiračního řetězce, u rostlin např. geny pro cytoplazmatickou pylovou sterilitu atd. Typická délka eukaryotního mitochondriálního genomu je například u kukuřice (*Zea mays* (Linné 1753)) 700 kbp, ale u jiných druhů se může pohybovat i v řádech 10 Mbp (Tomášková & Kubásek, 2017). Na obrázku 9 jsou uvedeny některé organismy a délky jejich mitochondriálních genomů v kpb, pro ilustraci 2 organismy s nejdelšími genomy na obrázku jsou rostliny tabák virginský a huseníček rolní, jejichž genomová délka se pohybuje kolem 400 kbp, což je mnohonásobně delší genom, než má člověk, jak můžeme na obrázku 9 vidět, jeho délka se pohybuje kolem 17 kbp.



**Obrázek 9 - Porovnání velikostí mitochondriálních genomů u různých organismů (kbp)**  
(Nielsen & Stewart, 2016)

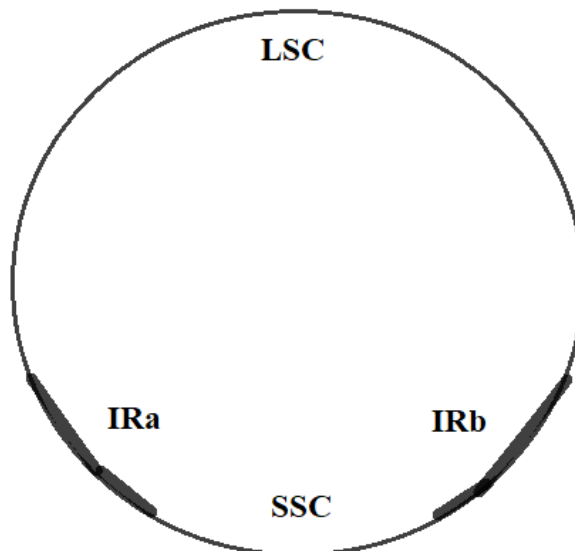
V posledních desetiletích došlo k velkému pokroku ve studiu mitochondriálního genomu, a to zejména u živočichů (Lavrov & Pett, 2016). Pro živočišnou mitochondriální DNA je typická maternální nerekombinační dědičnost a rychlé evoluční tempo vedoucí k vysokému intraspecifickému polymorfismu (Bastien, Favre, Collignon, Sperisen, & Jeandroz, 2003). Rostlinná mitochondriální DNA je obecně děděna po matce, zatímco chloroplastová DNA je obecně děděna po matce u krytosemenných, ale po otci (nebo po obou rodičích) u nahosemenných, což ukazuje

na genetický tok obou, semen i pylu (tabulka 2 a 3) (Birky, 1995; Latta, Linhart, Fleck, & Elliot, 1998; Vendramin, Lelli, Rossi, & Morgante, 1996).

### 3.4.2 Chloroplastová DNA (cpDNA)

Velikost plastidového genomu u rostlin je poměrně ustálená, povětšinou mezi 120–160 kbp, stejně tak jeho organizace (Tomášková & Kubásek, 2017). Plastidové genomy většiny zemských rostlin jsou kruhového tvaru složeného ze 4 částí, zahrnující 2 kopie velkých obrácených repetit (IRa a IRb) oddělených jedním velkým (LSC) a jedním malým (SSC) neopakujícím se regionem, což dokladuje obrázek 10 (Wu, Lin, Hsu, Wang, & Chaw, 2011).

IRa a IRb kódují 4 ribozomální RNA (16S, 23S, 4,5S a 5S), o kterých se předpokládá, že uchovávají genomické vlastnosti zděděné po sinicích (Tomioaka & Sugiura, 1983; Turmel, Otis, & Lemieux, 1999). Některé druhy rostlin kompletně ztratily kopii IR, avšak u čeledi *Pinaceae* tomu tak není. U této čeledi dochází spíše k redukci páru u obrácených repetit (236-495 bp) obsahující pouze 3' psbA a trnL-CAU geny (Lin, Huang, Wu, Hsu, & Chaw, 2010; Tsudzuki et al., 1992). Chloroplastová DNA u čeledi borovicovitých má různorodou organizaci mnoha repetit (Hipkins, Krutovskii, & Straws, 1995).



Obrázek 10 - Zjednodušená stavba rostlinného chloroplastového genomu, modifikováno (Khan, Khan, & Asif, 2010)

### 3.4.3 Rozdíly v dědičnosti mimojaderné DNA u krytosemenných, jehličnanů, tisovitých (*Taxaceae*) a cypřišovitých (*Cupressaceae*)

Mimojadernou dědičnost nelze studovat v souvislosti s jadernou dědičností, protože výsledky jejího křížení nejsou identické a neexistuje žádný univerzální štěpný poměr či poznatky o interakci mezi poznatky o jaderných genech.

Dědičnost podmíněná chloroplasty a mitochondriemi se neřídí mendelovskými zákony a je to tedy tzv. nemendelovská dědičnost. U krytosemenných rostlin je téměř pravidlem, že mtDNA i cpDNA jsou děděny po mateřské linii, ale existují i případy, kdy je cpDNA děděna po obou rodičích. Mnoho studií dědičnosti prokázalo, že u krytosemenných druhů dřevin jako jsou *Quercus*, *Populus*, *Liriodendron*, *Magnolia* a *Eucalyptus* jsou oba typy mimojaderné DNA děděny po matce (Byrne, Moran, & Tibbits, 1993; Dumolin, Demesure, & Petit, 1995; Mejnartowicz, 1991; Radetzky, 1990; Rajora & Dancik, 1992; Sewell, Qiu, Parks, & Chase, 1993).

U jehličnanů (nahosemenné rostliny), co se týká dědičnosti mimojaderné DNA, lze pozorovat překvapivé rozdílnosti. U borovicovitých (*Pinaceae*) je mtDNA děděna převážně maternálně (Mogensen, 1996; Neale et al., 1989). Avšak u tisovitých (*Taxaceae*) a cypřišovitých (*Cupressaceae*) je mtDNA děděna striktně paternálně (Kondo, Tsumura, Kawahara, & Okamura, 1998; Neale et al., 1989). Tento rozdílný

způsob dědění dělá organelární genomy ideálním nástrojem pro studium genetického toku a populačních struktur (Gugerli et al., 2001; Mitton, Kreiser, & Latta, 2000).

Chloroplastový genom je u většiny krytosemenných děděn po matce, avšak u jehličnanů, cypřišovitých (*Cupressaceae*) a tisoovitých (*Taxaceae*) je děděn po otci (Neale et al., 1989; White et al., 2007). Dědičnosti v závislosti jednotlivých genomů (nDNA, cpDNA a mtDNA) na kmenech a čeledích vybraných organismů jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3 - Dědičnost DNA v závislosti na kmenech a čeledích, (White et al., 2007)**

<b>Genom</b>	<b>Většina krytosemenných</b>	<b>Borovicovité</b>	<b>Tisovité a cypřišovité</b>
<b>nDNA</b>	biparentální	biparentální	biparentální
<b>cpDNA</b>	maternální	paternální	paternální
<b>mtDNA</b>	maternální	maternální	paternální

V tabulce 2 jsou vypsány vybrané charakteristiky jednotlivých genomů. Můžeme si všimnout, že se neliší pouze na základě dědičnosti, ale i co se týče struktury. Zejména jaderný genom od obou mimojaderných a pak dále v rekombinacích, kde je vidět, že k nim může docházet intramolekulárně (mezi atomy v molekule), ale i intermolekulárně (mezi molekulami).

### 3.5 Možnosti využití DNA pro analýzu genetické informace

Genetická informace uložená v molekule DNA je jedinečná pro každého jedince, který vykazuje generativní původ. Analýzou molekul DNA lze získat unikátní informace o genetické struktuře (genomu) každého jedince. I přes významný pokrok na poli molekulární biologie není u lesních dřevin doposud možné rutinně číst kompletní genetickou informaci. Proto se přistupuje k analýze částečné na vhodně vybraných oblastech genomu zájmových jedinců. Tyto vybrané úseky se označují jako molekulární genetické markery.

Molekulární marker je tedy vhodně vybraná jednotka informace o organismu, která byla získána analýzou DNA molekul. Markerem může být například známá sekvence DNA, délka fragmentu řetězce DNA a podobně. Genetické markery mohou být generovány jak z jaderné, tak mimojaderné (organelární) DNA. Pro účely bakalářské práce byla zvolena metoda mikrosatelitových markerů lokalizovaných na mitochondriích a chloroplastech.

Mikrosatelity (SSRs – *simple sequence repeats*) jsou krátké regiony DNA, které obsahují opakující se krátké segmenty, jejichž délka je kolem 2-6/8 párů bazí a právě ty jsou využívány jako markery (Eriksson et al., 2006). Tyto tandemové repetice se vyskytují v celém genomu, avšak spíše je lze nalézt v nekódující části genomu. Jelikož jich existuje obrovské množství variant, stávají se mikrosatelitové markery užitečným nástrojem pro identifikaci jednotlivých jedinců a pro studium mezipopulačního genetického toku. U mitochondrií a chloroplastů je metoda studia repetitivních úseků DNA použitelná obdobně jako u jaderného genomu, obecně však organelární SSRs markery vykazují z důvodu vyšší konzervativnosti organelární DNA nižší míru polymorfismu.

Mikrosatelitové sekvence jaderné DNA jsou dosud nejlépe průkazné DNA markery použitelné pro odvození struktury a populační dynamiky. Zatímco organelární markery se prokázaly jako účinné pro genealogické a evoluční studie populací (Zhang & Hewitt, 2003). U rostlin až na pár výjimek je rychlost vývoje mtDNA nejpomalejší ze všech tří genomů (Wolfe, Li, & Sharp, 1987). Naproti tomu má vyšší rychlost rekombinace (Jeffrey D. Palmer & Herbon, 1988).

Chloroplastové markery jsou mnohdy universální pro celou čeleď, popř. rod, a tak jsou testovány i na jiných druzích dřevin, než pro které byly vyvinuty. Markery ze článku od Vendramina a kol. (1996) byly vyvinuty a testovány na borovici bělokore

(*Pinus leucodermis* (Antoine 1864)) a měly ověřit, zda amplifikují úseky cpDNA či ne. Výsledky těchto markerů byly srovnány s dalším druhem ze stejné čeledi, s borovicí Thunbergovou (*Pinus thunbergii* (Parlatore)), která byla vybrána pro porovnání, protože její kompletní chloroplastový genom byl osekvenován již dříve (Wakasugi et al., 1994). Univerzálnost těchto chloroplastových mikrosatelitových markerů byla dále testována na některých druzích rodu *Pinus* a poté i na různých rodech (*Abies*, *Cedrus* a *Picea*) stejné čeledi. U některých dřevin rodu *Pinus* byly po použití primerových párů objeveny amplifikované produkty stejných velikostí, jako ty prokázané u borovice bělokoré (*Pinus leucodermis* (Antoine 1864)). Amplifikace byla 100 %. U dřevin z čeledi *Pinaceae* jiného rodu, než *Pinus* proběhla amplifikace také úspěšně, konkrétně u smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.) byla 75 %. Proto byly v této práci použity primery právě z již zmíněného článku.

### 3.5.1 Využití jaderné DNA

Jaderné mikrosatelitové markery jsou nejčastěji využívány pro zhodnocení variability na populační úrovni. Jaderné primery jsou druhově specifické, nicméně existují i mikrosatelitové markery, které jsou přenositelné v rámci jednoho rodu (Besnard, Acheré, Rampant, Favre, & Jeandroz, 2003). Naopak nejsou moc vhodné pro studium genetického toku, jelikož často selžou v rozlišení genového toku ze semen a genového toku z pylu u přirozených populací (Wagner, 1992). Proto je pro studium genového toku vhodnější zvolit markery děděné uniparentálně.

Příklady využití jaderných mikrosatelitových markerů:

- identifikace jedinců (klonů)
- hybridizace
- studium migrace rostlin
- fylogeneze
- evoluční vývoj
- určení paternity
- zhodnocení variability na populační úrovni

### 3.5.2 Využití organelární DNA

Podle Lowera (2004) je velmi vhodné využití cpDNA markerů při metodě sekvenování pro zjištění fylogeneze (rekonstrukce rodokmene) a fylogeografie. Z geografického rozložení variability organelární DNA je možné vyvodit závěry o minulém genetickém toku a migraci (Maghuly et al., 2008). Dobře použitelné jsou tyto markery pro zjištění genetické diverzity, diferenciaci populací, genový tok, polyploidizaci, hybridizaci, ale jsou nepoužitelné pro genotypování jedinců. Dle stejných autorů jsou dobře použitelné markery rostlinné mtDNA pro diferenciaci populací a ucházející pro zjištění genetické diverzity, genového toku, hybridizace, fylogeneze a fylografie. Naopak nevhodné jsou rostlinné mtDNA markery pro polyploidizaci a genotypování jedinců.

Mikrosatelitové chloroplastové primery většinou amplifikují nekódující regiony DNA. Jelikož u kruhových molekul cpDNA se ukázalo, že jsou uchovány ve své struktuře (Jeffrey D. Palmer & Stein, 1986). To vedlo k vytvoření univerzálních primerů, které mohou amplifikovat nekódující regiony, jež jsou u většiny zemských rostlin odděleny 2 kódujícími sekvencemi (Taberlet, Gielly, Pautou, & Bouvet, 1991). Jak již bylo zmíněno u rodu *Picea* a dalších nahosemenných je cpDNA genom děděn paternálně skrz pyl (Mogensen, 1996).

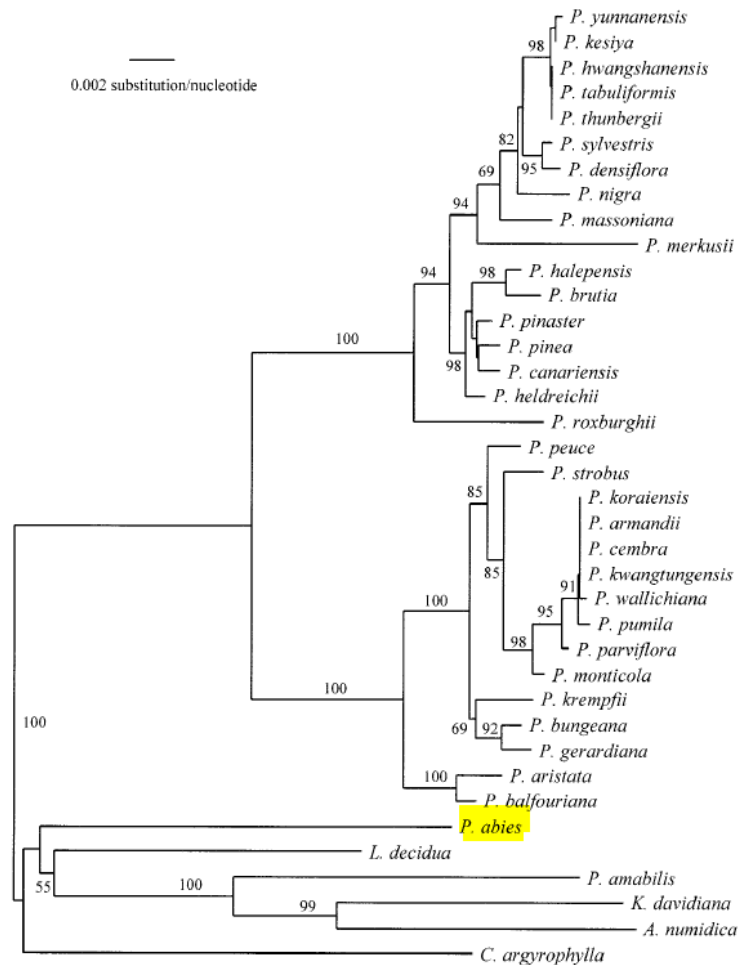
Podle (Bouillé, Senneville, & Bousquet, 2011) byly určeny lokusy *rbcL*, *trnK* a *trnTLF* pro 35 zástupců celého cirkumpolárního rodu *Picea*, které již byly použity v předešlých fylogenetických studiích (Qiao, Ran, Li, & Wang, 2007; Quinn, Price, & Gadek, 2002; Wang, Tsumura, Yoshimaru, Nagasaka, & Szmidt, 1999; Wei & Wang, 2003). Podle jejich metodiky vědci přišli na to, že cpDNA může být lepším taxonomickým než fylogenetickým markerem, vzhledem k tomu, že integruje výsledek laterální genové výměny způsobené nedávnou nebo starší interspecifickou hybridizací. Při hybridizaci čeledi *Pinaceae* by cpDNA měla být lepším indikátorem druhového vymezení než mtDNA, jelikož markery přidružené k nejrozptýlenějšímu pohlaví by lépe vymezovaly druhy (Rémy J. Petit & Excoffier, 2009). Obecně řečeno jsou chloroplastové markery vhodné pro zhodnocení variability na druhové úrovni, popř. i na vnitrodruhové úrovni, přičemž existují i univerzální primery.



### 3.5.3 Fylogenetický vývoj

Fylogeneze neboli fylogenetický vývoj je proces založený na evoluční teorii, který pozoruje vývoj druhů organismů. S předmětem studia fylogeneze souvisí fylogenetika, která se zabývá především vývojovými příbuzenskými vztahy mezi organismy na základě představy, že všechny organismy mají univerzálního společného předka (Kalina & Váňa, 2005).

V odborné literatuře zaměřené na lesní dřeviny je fylogenetický vývoj často znázorněn pomocí diagramu, kterému se říká dendrogram. Na obrázku 11 je ukázka hierarchického klastrování dřevin z článku od Wanga a kol. (1999), kde se autoři zabývali fylogenetickými vztahy euroasijských druhů borovic a dalších dřevin ze stejné čeledi, mezi nimiž byl i smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Vytvoření tohoto dendrogramu předcházely analýzy intronových sekvencí na 4 vybraných chloroplastových lokusech. Fylogenetickým vývojem na družích rodu *Picea* se často v souvislosti s geografickým vývojem druhů dále zabývali například Lockwood a kol. (2013), Bouillé a kol. (2011) a Tollefsrud a kol. (2008). Kolektiv autorů v čele s Linem (2010) zkoumal korelace fylogenetických vztahů čeledi *Pinaceae* na základě cpDNA. Kde uvádí i zjištění, že jedna ze čtyř rozdílných forem cpDNA konkrétně forma A, která je typická pro rod *Picea*, se jeví jako mnohem podobnější formě A u rodu *Cedrus* než té, co má rod *Pinus*. I přestože jsou si rody *Picea* a *Pinus* fylogeneticky bližší než s rodem *Cedrus*.



Obrázek 11 - Dendrogram vybraných druhů z čeledi *Pinaceae* vytvořený na základě vzdálenosti kombinovaných sekvencí, (Wang et al., 1999)

### 3.5.4 Míra variability a dědičnost

Míra variability jedinců je určena detekovaným polymorfismem, což je výskyt dvou nebo více různých alel na jednom lokusu v rámci populace. Populační frekvence jejich výskytu musí zároveň přesahovat 1 % (Holasová, Radilová, & Bunček, 2006). Pokud je frekvence výskytu nižší, považuje se tato variabilita za mutaci. Polymorfismy se často nachází v intronech, které přímo nepodléhají selekčním procesům. Pomocí lokalizace jednotlivých polymorfismů je možné vytvářet genetické mapy.

Jednou z nejběžnějších metod zkoumání polymorfismu je analýza délkového polymorfismu repetitivních motivů – *simple sequence repeats* (SSRs) neboli mikrosatelitů. Tyto sekvence jsou nejčastěji dinukleotidové tzn., opakujícím se motivem je dvounukleotidová repetice např. CACA, přičemž počet jejich repetice je variabilní. Základní repetitivní jednotka je veliká cca 2–4 bp (Kohoutová & Otová, 2017).

K variabilitě mikrosatelitů přispívá polymorfismus, který vznikl nepřesným párováním komplementárních vláken DNA, obsahující repetitivní sekvenci, která vznikla pravděpodobně díky replikačnímu sklouznutí. To způsobilo delece a inzercie repetice v nově syntetizovaném řetězci. Tento jev může způsobit i nerovnoměrný crossing over nebo výměna sesterských chromatid. Výhodou mikrosatelitů je i to, že jsou vysoce specifické pro jednotlivce, a jsou tak vhodné i pro určování rodičovství.

## 4 Metodika

### 4.1 Návrh metodiky pro chloroplastové markery

Pro návrh metodiky pro chloroplastové markery byly prostudovány příslušné zdroje, zejména vědecké články od roku 1995 do současnosti. Bylo nalezeno 54 různých markerů testovaných více jak deseti výzkumnými týmy, přičemž některé markery byly použity ve více publikacích. Jednalo se především o markery vhodné na analýzu mikrosatelitů. V tabulce 4 jsou uvedeny názvy jednotlivých publikací, kde byly tyto markery uvedeny a testovány. Každý marker je uveden pouze jednou, podle toho, ve které publikaci se objevil dříve.

Tabulka 4 - Chloroplastové markery uvedené ve vědeckých publikacích

Publikace	Markery	Publikace	Markery
Demesure et al., 1995	<i>trnH-trnK</i>	Provan et al., 1998	<i>Pt107517</i>
	<i>trnK-trnK</i>		<i>Pt109567</i>
	<i>trnC-trnD</i>		<i>Pt110048</i>
	<i>trnD-trnT</i>		<i>PCP1289</i>
	<i>psbC-trnS</i>		<i>PCP9434</i>
	<i>trnS-trnfM</i>		<i>PCP26106</i>
	<i>psaA-trnS</i>		<i>PCP30277</i>
	<i>trnS-trnT</i>		<i>PCP36567</i>
	<i>trnM-rbcL</i>		<i>PCP41131</i>
Dumolin et al., 1995	<i>trnT-trnF</i>		<i>PCP45071</i>
Vendramin et al., 1996	<i>Pt1254</i>		<i>PCP48256</i>
	<i>Pt9383</i>		<i>PCP51928</i>
	<i>Pt15169</i>		<i>PCP63771</i>
	<i>Pt26081</i>		<i>PCP71987</i>
	<i>Pt30204</i>		<i>PCP79987</i>
	<i>Pt36480</i>		<i>PCP87314</i>
	<i>Pt41093</i>		<i>PCP100842</i>
	<i>Pt45002</i>		<i>PCP102652</i>
	<i>Pt48210</i>		<i>PCP107165</i>
	<i>Pt51873</i>		<i>PCP109612</i>
	<i>Pt63718</i>	Du et al., 2009	<i>trnL-trnF</i>
	<i>Pt71936</i>		<i>rps5-trnS</i>
	<i>Pt79951</i>		<i>trnS-trnG</i>
	<i>Pt87268</i>		<i>ndhK/C</i>
	<i>Pt100783</i>	Bouillé et al., 2011	<i>rbcL</i>
<i>Pt102584</i>	<i>trnTLF</i>		
<i>Pt107148</i>	Lockwood et al., 2013	<i>matK</i>	

Na základě rešerše těchto publikací se tato práce zaměřuje na článek od Vendramina a kol. (1996) a jeho metodiku. V tomto článku bylo použito 20 chloroplastových primerů na 2 dřevinách rodu *Pinus*, kde byly tyto primery použity pro analýzu 2 druhů dřevin z rodu *Pinaceae*, a to konkrétně *Pinus thunbergii* a *Pinus leucodermis*, popis těchto primerů je k nahlédnutí v tabulce 5. Oba primery jsou mikrosatelitové a mononukleotidové, jejich repetice neboli opakování je vždy po jednom nukleotidu, což je typické pro chloroplastové mikrosatelity. Teplota annealingu se pohybuje kolem 58 °C a délka, kterou lze amplifikovat pomocí PCR, je u jednoho z primerů 146 resp. 148 bp a u druhého 92 resp. 93 bp v závislosti na dřevině.

**Tabulka 5 - Popis použitých primerů dle autorů (Vendramin et al., 1996)**

Autor a rok vydání	Název	F	R	Repetice	Páry bazí [bp]	Teplota annealingu [°C]
Vendramin et al., 1996	Pt 71936	TTCAT TGGAA ATACA CTAGC CC	AAAA CCGT ACAT GAGA TTCCC	(T) <sub>14</sub> , (T) <sub>16</sub>	146, 148	57,9; 58,1
Vendramin et al., 1996	Pt 63718	CACAA AAGGA TTTTTT TTCAG TG	CGAC GTGA GTAA GAAT GGTT G	(T) <sub>9</sub> , (T) <sub>10</sub>	92, 93	57,9; 58,3

Jelikož se předpokládá, že u chloroplastového genomu dochází k vysokému stupni uchování celé sekvence jeho DNA, je cpDNA vhodná pro vývoj primerů, které by mohly fungovat pro širší spektrum příbuzných druhů. Proto je užití primerů z tohoto článku vhodné i u rodu *Picea*, který se jako rod *Pinus* řadí pod stejnou čeleď. Z 20 primerů byly vybrány 2, které stejní autoři Vendramin a kol. (2000) použili o 4 roky později při mikrosatelitové analýze u smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.).

Primery Pt 63718 a Pt 71936 byly vybrány díky svému vysokému polymorfismu, díky délkové variabilitě zachycené uvnitř i vně populací, a protože vytváří fragmenty o různých velikostech. Tyto primery jsou také vhodné pro tvorbu multiplexů, což bylo

využito i v případě této práce. Pro sestavení multiplexu by se hodily i primery od Provana a kol. (1998), které by vzhledem k podobné teplotě annealingu (60 °C) a již ověřené funkčnosti na smrku ztepilém prokázané ve vědeckém článku od Maghulioho a kol. (2006) skvěle fungovaly. Jelikož v této publikaci byly použity dohromady s primery od Vendramina a kol. (1996).

Na základě všech informací a parametrů byly nakonec zvoleny markery pro ověření původní metodiky od (Vendramin et al., 1996) nad rámec zadání bakalářské práce. Popis vybraných primerů je v tabulce 5.

## 4.2 Návrh metodiky pro mitochondriální markery

Za účelem návrhu metodiky pro studium mitochondriálních markerů byly prostudovány odborné články na toto téma od roku 1995 do současnosti. Bylo nalezeno 31 markerů použitých v metodikách u více jak 17 autorů, přičemž některé markery posloužily k analýzám ve více publikacích během let. Jednalo se převážně o markery na bázi repetitivních mikrosatelitových frekvencí. V tabulce 6 je vyobrazeno, jaké markery byly použity v metodikách jednotlivých vědeckých článků. Shodné podbarvení buňky označuje opakované použití metodiky v těchto vydáních.

Tabulka 6 - Mitochondriální markery uvedené ve vědeckých publikacích

Publikace	Markery	Publikace	Markery	
Demesure, Sodzi, & Petit, 1995	<i>nad1</i> exonB/C	Jaramillo-Correa et al., 2003	<i>cox1</i> intron 1	
	<i>nad4</i> exon1/2		<i>matR</i> intron 1	
	<i>nad4</i> exon2/4		<i>mp6</i>	
	<i>rpS14-cob</i>		<i>nad1</i> intron B/C	
Dumolin et al., 1995	<i>nad4</i> exon1/2		<i>nad3-rps12</i>	
Christoph Sperisen, Büchler, & Mátyás, 1998	<i>nad1</i> exonB/C		<i>nad3</i> intron 1	
	<i>nad1</i> intron 2		<i>nad4L-orf25</i>	
Sperisen et al., 2001	<i>nad1</i> intron 2		<i>nad5</i> intron 1	
Gugerli et al., 2001	<i>nad1</i> intron 2		<i>nad7</i> intron 3	
Jeandroz, Bastien, Chandelier, Du, & Favre, 2002	<i>mh02</i>			<i>rpS14-cob</i>
	<i>mh05</i>		Bastien et al., 2003	<i>mh44</i>
	<i>mh08</i>		Maghuly, Pinsker, Praznik, & Fluch, 2006	<i>mt15-D02</i>
	<i>mh09</i>			<i>mt23-D02</i>
	<i>mh09'</i>		a Maghuly, Nittinger, Pinsker, Praznik, & Fluch, 2007	<i>mt1H01</i>
	<i>mh10</i>	Tollefsrud et al., 2008	<i>nad1</i> intron 2	
	<i>mh27</i>	Tollefsrud et al., 2009	<i>nad1</i> intron 2	
	<i>mh33</i>	Du, Petit, & Liu, 2009	<i>nad1</i> intron B/C	
	<i>mh33'</i>		<i>nad5</i> intron 1	
	<i>mh34</i>	Litkowiec, Dering, & Lewandowski, 2009	<i>mt15-D02</i>	
	<i>mh35</i>		<i>nad1</i> intron B/C	
	<i>mh38</i>	Bouillé et al., 2011	<i>nad1</i> intron 2	
	<i>mh44</i>	Dering, Misiorny, Lewandowski, & Korczyk, 2012	<i>mt15-D02</i>	
	<i>mh50</i>	Lockwood et al., 2013	<i>nad5</i> intron 1	
			<i>nad1</i> intron 2	

Při vlastním návrhu metodiky pro mitochondriální markery budou vybrány markery použité v těchto vědeckých článcích: *nad1* intron 2 (Sperisen et al., 2001), *mh44* (Jeandroz et al., 2002) a *mt15-D02* (Maghuly et al., 2006). V tabulce 7 jsou uvedeny jednotlivé parametry vybraných markerů, přičemž teplota annealingu je převzata z metodiky v jednotlivých článcích a velikosti lokusů jsou převzaty z genové databáze. Tyto markery byly zvoleny díky svým parametrům a proto, že byly použity ve více studiích a byla již ověřena jejich funkčnost a jejich polymorfismus. Díky markeru *nad1* intron 2 se například potvrdilo, že postglaciální rekolonizace Alp pochází z dvou konkrétních refugií (Gugerli et al., 2001).

Velké množství těchto markerů již bylo testováno na většině území západní Evropy, a tak by bylo ideální spojit tyto primery do multiplexu. Vzhledem k podobné teplotě nasedání primeru na templátovou DNA by u lokusu *nad1* intron 2 a *mh44* mělo docházet ke kompatibilní reakci.

**Tabulka 7 - Popis vybraných primerů dle publikací**  
(Jeandroz et al., 2002; Maghuly et al., 2006; Sperisen et al., 2001) a <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Autor a rok vydání	Lokus	F	R	Genová banka	Velikost lokusu [bp]	Teplota annealingu [°C]
Sperisen et al., 2001	<i>nad1</i> intron 2	CTCTC CCTC ACCC ATAT GATG	ACAA AGCC CCTTT GAGG G	KU902027	874	57
Jeandroz et al., 2002	<i>mh44</i>	ATGA CTGG AAGA ATTG CTCA C	TTCA CTTG ATAC TCAC CCCC	AY184284	447	56
Maghuly et al., 2006	<i>mt15-D02</i>	TATCT GACT TGCC TTATC	ATCC GAAT ACAT ACAC C	AY897577	1552	50

Jelikož je praktická část této práce zaměřena zejména na metodiku pro chloroplastové markery, je zde uvedena alespoň teorie metodiky dle Sperisena a kol. (2001) pro mitochondriální marker *nad1* intron 2, která by mohla být



také použita. Tento marker je vnitřní fragment tandemové repetice druhého intronu mitochondriální NADH dehydrogenázy podjednotky 1 (*nad1*) genu smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.).

Stejně jako u metodiky pro markery cpDNA budou odebrány vzorky jehličí a izolována jejich DNA, popř. zkontrolovány koncentrace a čistoty, přičemž lze využít agarózového gelu nebo spektrofotometrického přístroje např. Nanodropu.

Vzorky izolované DNA budou naředěny na 4 ng/μl před polymerázovou řetězovou reakcí. Pomocí fluorescenčně barevně značeného primerového páru (tabulka 7), bude amplifikován *nad1* intron 2 fragmentu. Na rozdíl od cpDNA markerů je třeba k tomuto fragmentu přidat EcoRV restriční enzym, který dokáže *nad1* rozštěpit. Po ethanolovém srážení a rozpuštění vzorků v 5 – 7,5 μl vody bude přepipetováno adekvátní množství zhruba 1–2 μl amplifikovaného a rozštěpeného produktu PCR do roztoku velikostního standardu, který je tvořen 12 μl formamidu a 0,5 – 1 μl ROX500 (Biosystems). Následuje fragmentační analýza pomocí kapilární elektroforézy. K vyhodnocení výstupních dat (elektroferogramy ve formátu .fsa) bude využit vhodný software (např. GeneMarker® nebo GeneMapper®).

### **4.3 Výběr metody analýzy organelární DNA**

Na základě vypracované rešerše zaměřené na možnosti použití molekulárních markerů u mimojaderné DNA a možnosti její analýzy, byla nad rámec zadání práce vybrána a ověřena metodika studia genetické variability pomocí mikrosatelitových chloroplastových markerů, přičemž metodicky bylo čerpáno především z vědecké publikace (Vendramin et al., 1996) a dalších nalezených publikací (Maghuly et al., 2006; Provan et al., 1998; Vendramin et al., 2000).

Uvedená metodika je založena na analýze variability v počtu opakování T repetice v amplifikovaných fragmentech. Oba vybrané primery jsou mikrosatelitové a mononukleotidové, to znamená, že se jejich repetice opakuje po jednom nukleotidu, a to konkrétně právě po nukleotidu T.

#### 4.4 Lokalita a sběr vzorků

V rámci předchozích výzkumných aktivit na Katedře genetiky a fyziologie lesních dřevin byly vytipovány předpokládaně autochtonní či jinak význačné populace smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.) v České republice (tabulka 8). Jednalo se o 10 lokalit, na kterých bylo souhrnně odebráno 110 vzorků jehličí. Z této dostupné kolekce rostlinného materiálu bylo pro tuto práci vybráno 16 jedinců, na kterých bylo provedeno ověření funkčnosti navržené metodiky za účelem detekce případné genetické variability. Byly vybrány vzorky původem z různých geografických oblastí (obrázek 12, prostorová distribuce předmětných přírodních lesních oblastí), maximalizoval se tak předpoklad odlišné genetické struktury jedinců na studovaných lokusech.

Tabulka 8 - Označení lokalit sbíráních vzorků

Označení vzorku	PLO	Lesní správa	Lokalita (č. genové základny)
SM2, SM3	21b	Frýdlant	85-1 Jindřichovické smrčiny
SM13	11b	Přimda	LS Přimda
SM32, SM35, SM40	13	Boubín	016-1 Zátoň – Kubova Huť
SM50	14	Nové Hrady	046-1 Novohradské hory
SM59, SM63	16	Pelhřimov	37 Černovice
SM71, SM80	27	Jeseník	164 - Rejvíz
SM89	40a	Frýdek-Místek	182 Lysá Hora
SM96	30	Prostějov	LS Prostějov – chlumní
SM102, SM108, SM110	25	Rychnov nad Kněžnou	LS Rychnov



Obrázek 12 - Přírodní lesní oblasti vybraných lokalit, modifikováno, ÚHUL a Mapy Google

## **4.5 Izolace DNA**

### **4.5.1 Příprava vzorků a homogenizace**

Odebraný hluboce zmražený rostlinný materiál bylo potřeba před vlastní izolací DNA nejprve zhomogenizovat. Materiál byl vyjmut z mrazicího boxu, kde byl uchováván při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v uzavíratelných sáčcích společně s kuličkami silikagelu pro zajištění stabilní vlhkosti. Jehlice smrku v celkovém množství 80–100 mg byly vyjmuty ze sáčku, nakrájeny pomocí skalpelu na drobné fragmenty a vloženy do 2 ml nadepsaných zkumavek s příslušnou identifikací. Při této přípravě je nutné si dávat pozor na vzájemnou kontaminaci vzorků, které se zabrání přečišťováním pracovní plochy a pracovních nástrojů čistým lihem vždy po přípravě jednoho vzorku, respektive před přípravou následujícího. Po tomto primárním fragmentačním zpracování materiálu mohl začít proces drcení.

Do každé zkumavky byly přidány 2 kovové drtící kuličky vyrobené ze slitiny oceli a karbidu wolframu, které drtí rostlinný materiál ve zkumavkách pomocí mechanického působení v oscilačním mlýnu. Uzavřené zkumavky byly vloženy do konzole oscilačního mlýnu, která byla přenesena do polystyrenové vany s tekutým dusíkem. Tekutý dusík vzorky zamrazil na cca  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tato fáze je velmi důležitá, protože tekutý dusík způsobí, že rostlinné tkáně zkřehnou a zároveň ztvrdnou. Pro oscilační mlýn pak je mnohem jednodušší tkáně rozdrtit na jemný prach. Pro tuto homogenizaci byl použit oscilační mlýn značky RETSCH.

Samotná fáze drcení trvala cca 3 minuty při pohybech oscilačního mlýna s frekvencí 30 kmitů za 1 sekundu. Po nadrcení byla u všech vzorků okulárně zkontrolována kvalita drcení. Při absenci viditelně hrubých částí a dostatečném množství jemného prachu byla homogenizace považována za úspěšnou. V opačném případě bylo nutné proces drcení opakovat.

### **4.5.2 Extrakce a purifikace DNA**

Pro izolaci rostlinné DNA byl použit izolační kit od společnosti Geneaid s názvem Genomic DNA Mini Kit (Plant). Kit byl vybrán i s ohledem na to, že dle výrobce, je vhodný i pro purifikaci mitochondriální a chloroplastové DNA.

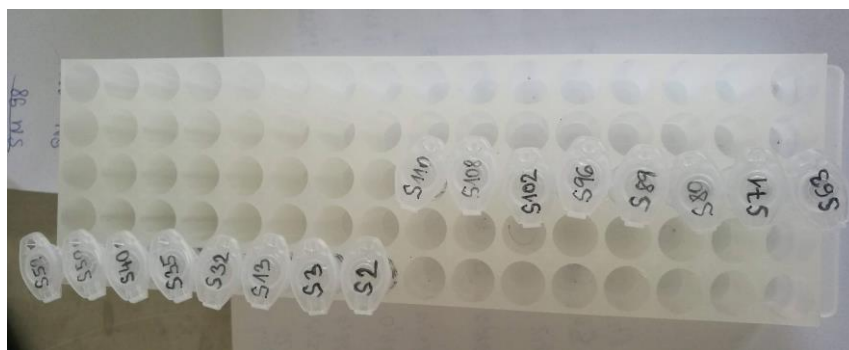
Jako první krok před samotnou izolací bylo nutné si připravit všechny potřebný materiál, pomůcky a laboratorní přístroje, což výrazně usnadnilo a zrychlilo celý proces práce. V podstatě byly použity 3 typy přístrojů: vortex – sloužící k promíslení roztoků, centrifuga – k odstředění frakcí roztoku dle hmotnosti, třepačka s ohřevem – pro udržení předepsané teploty a v neposlední řadě sada mikropipet o různých rozsazích objemů (0–10  $\mu$ l, 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l) sloužící k přenesení definovaného objemu tekutiny. Dále byl nutný spotřební materiál: latexové rukavice, plastové pipetovací špičky různých velikostí, zkumavky, tenký fix a protokol.

Ke každému zhomogenizovanému vzorku bylo připipetováno 400  $\mu$ l GP1 roztoku, který zajistí smočení povrchu jemných částic ve zkumavce a provede prvotní chemické narušení struktury buněčných stěn, jinými slovy dojde k lyzi buněk. Dále bylo do každého vzorku přidáno 5  $\mu$ l RNázy, která odstraňuje ze vzorků pro tuto práci nežádoucí RNA. Pipetovaný objem RNázy je poměrně malý, a tak je potřeba s ním nakládat opatrně a s rozvahou, proto byla při pipetování několikrát v každém vzorku pipeta s jejím obsahem propláchnuta, tak aby bylo odstraněno veškeré množství RNA v každém vzorku. Dále bylo nutné všechny vzorky promísit pomocí vortexu a vložit zkumavky do třepačky s ohřevem předehřáté na 60 °C pro maximální účinek RNázy. Inkubace vzorků v třepačce s ohřevem trvala 50 minut. Třepačka s ohřevem zároveň zajišťuje krouživými pohyby důkladné smíšení všech složek a zároveň umožňuje teplotní stabilitu RNázy. Ihned po ukončení inkubační fáze bylo do zkumavek co nejrychleji přidáno 120  $\mu$ l GP2 roztoku, následně byly vzorky smíseny pomocí vortexu a uloženy k inkubaci na 5 minut do předem připraveného ledu. Díky prudké změně teplot došlo k vysrážení detergentů, bílkovin a polysacharidů. Následně byla použita centrifuga na dobu 1,5 minuty při rychlosti 8000 otáček za minutu pro separaci roztoku a sraženin, které zůstaly u dna zkumavky. V dalším kroku bylo třeba si připravit odpovídající počet zkumavek s bílými filtry, přes které bylo přepipetováno 400  $\mu$ l roztoku (bez sraženin) ze zkumavek po vyjmutí z centrifugy. Bílý filtr dokáže zachytit zbylé hrubé nečistoty, které roztok mohl zatím obsahovat. Zkumavky s filtry byly opět vloženy do centrifugy a stočeny po dobu 1 minuty rychlostí 1000 otáček za minutu. Odstředivá síla v centrifuze umožnila roztoku průchod filtrem a nečistoty zachytila na filtru. Přefiltrovaný roztok byl přepipetován do nových 2 ml zkumavek s kulatým dnem. Každý vzorek byl doplněn o 1,5 násobek svého objemu GP3 roztokem za současného smíšení vzorků vortexem či tzv. propipetování ihned ve zkumavce.

Dále byly připraveny nové zkumavky tentokrát se zeleným filtrem. Zelený filtr slouží k zachycení DNA. Do těchto filtrů se z kapacitních důvodů napipetovalo 600  $\mu$ l roztoku a opět byla využita centrifuga po dobu 2 minut s rychlostí 15 000 otáček za minutu. Po skončení cyklu v centrifuze bylo zkontrolováno, zda celý objem roztoku prošel filtrem. Tímto byla DNA navázána v modrém filtru a přefiltrovaný roztok byl ekologicky zlikvidován. Tento krok byl zopakován se zbytkem roztoku až do úplného přefiltrování celého objemu roztoku.

DNA navázanou ve filtru bylo nutno ještě vyčistit. Do filtru bylo přidáno 400  $\mu$ l W1 roztoku a vzorky byly opět dány do centrifugy. Odstředování trvalo 30 sekund při rychlosti 15 000 otáček za minutu. Tento roztok slouží k vymytí nečistot z filtru. Odstředěný roztok se ekologicky zlikvidoval a přes filtr se napipetovalo 600  $\mu$ l Wash roztoku, který obsahoval ethanol. Opět se vzorky umístily do centrifugy a stočily se zase na 30 sekund rychlostí 15 000 otáček za minutu. Znovu byl zlikvidován odstředěný roztok prošlý filtrem. Zkumavka s filtrem se tentokrát vložila do centrifugy tzv. na sucho, aby na filtru nezůstal čistící roztok a s ním ethanol. Doba stáčení byla 3 minuty rychlostí 15 000 otáček za minutu.

V poslední eluční fázi byl zelený filtr se zachycenou a přečištěnou DNA přemístěn do finální 1,5 ml zkumavky, která byla řádně popsána číslem vzorku. Přímo do středu filtru bylo napipetováno 100  $\mu$ l elučního roztoku, který má za úkol uvolnit DNA ze struktury filtru. Potřebné množství elučního roztoku bylo předem temperováno na teplotu 60 °C pro zlepšení eluční vlastnosti tohoto roztoku. Po uplynutí doby 3 minut, kdy se roztok stačil vsáknout do filtru, byly vzorky vloženy do centrifugy a stočeny rychlostí 13 000 otáček za minutu po dobu 3 minut. Nakonec byl filtr odstraněn a zkumavky s obsaženou DNA byly nadepsány pro příslušnou identifikaci viz obrázek 13.

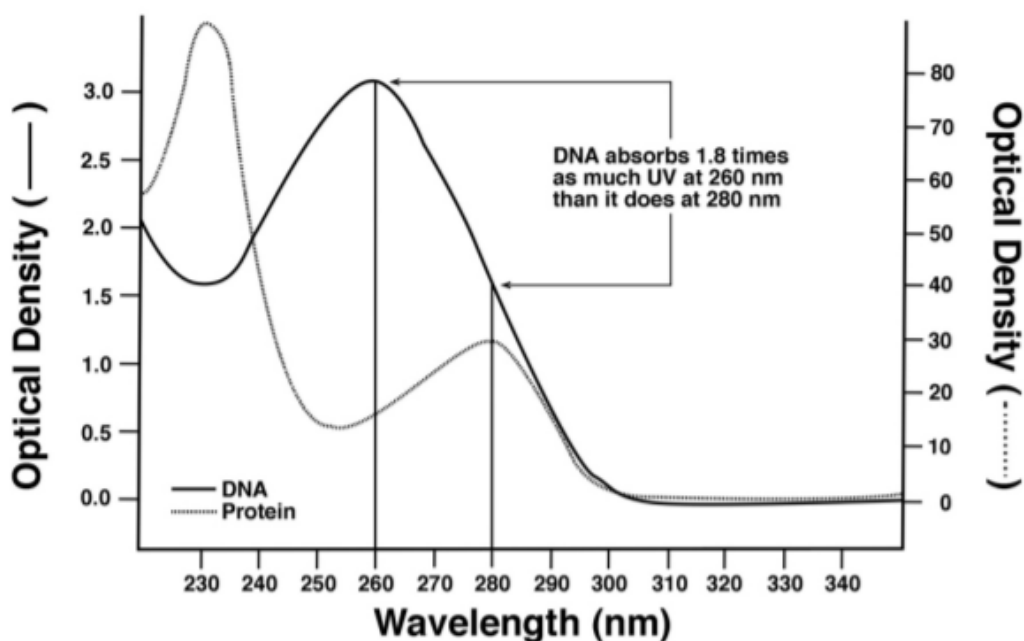


**Obrázek 13 - Označené dvě série po osmi vzorcích izolované DNA**

## 4.6 Měření koncentrace DNA

Pro ověření kvality izolačního postupu byla změřena koncentrace a čistota DNA. Měření a vyhodnocení proběhlo na přístroji NanoDrop od společnosti Thermo Fisher SCIENTIFIC, který provádí spektrometrické vyhodnocení. Všechny vzorky byly před měřením smíseny vortexem, aby byla zajištěna homogenita v celém objemu vzorku. Pipetovaný objem byl 1  $\mu$ l roztoku izolované DNA. Jako referenční vzorek bez DNA byl zvolen eluční roztok z kity pro izolaci rostlinného materiálu od firmy Geneaid. Aby byl vzorek DNA považován za čistý, musí se jeho hodnota na rozhraní 260/280 nm pohybovat v rozmezí od 1,7 do 1,9, což je ideální stav, při kterém se hodnota koncentrace izolované DNA jeví jako neznečištěná příměsí jiných látek (RNA, bílkovinami atd.). Čím více se hodnoty liší od tohoto rozmezí, tím více indikují znečištění vzorku. Dále byl sledován průběh spektrální křivky viz obrázek 14, kde je vidět optimální průběh této křivky u DNA a u proteinu.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 11. Po změření byly vzorky skladovány v mrazicím boxu při teplotě  $-80$  °C.



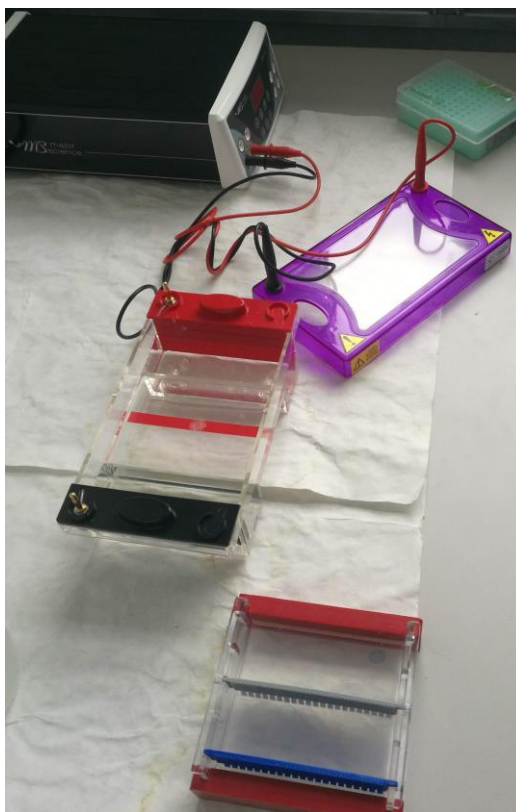
Obrázek 14 - Spektrální křivka čistého DNA a proteinu (na ose y je optická hustota, na ose x je vlnová délka), (Rothman, 2010)

## 4.7 Kontrola kvality DNA

Pro kontrolu kvality DNA byla použita metoda tzv. horizontální elektroforézy neboli gelové elektroforézy, v tomto případě byla jako gel použita agaróza. Princip elektroforézy jako separační metody spočívá ve schopnosti odlišit látky na základě různé pohyblivosti v gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Její využití v molekulární biologii je zejména pro zjištění, zda se mikrosatelitové primery amplifikují či ne a zda jsou polymorfní, dále se používá pro separování velkých iontů (sacharidy, peptidy, sestříhy DNA a RNA) například za účelem zjištění kvality DNA (Koolman & Röhm, 2012).

Jako médium byl zvolen agarózový gel o koncentraci agarózy 0,73% (0,4 g agarózy). Izolovaná DNA byla u všech vzorků naředěna ultra čistou vodou na koncentraci 10 ng/ $\mu$ l, případně lze použít i eluční roztok.

Elektroforetická soustava (obrázek 15) je složena z částí: elektroforetická vana, elektrody, bezpečnostní víko, drážka na vytvoření jamek v gelu a samozřejmě zdroj elektrického napětí.



Obrázek 15 - Soustava na horizontální elektroforézu



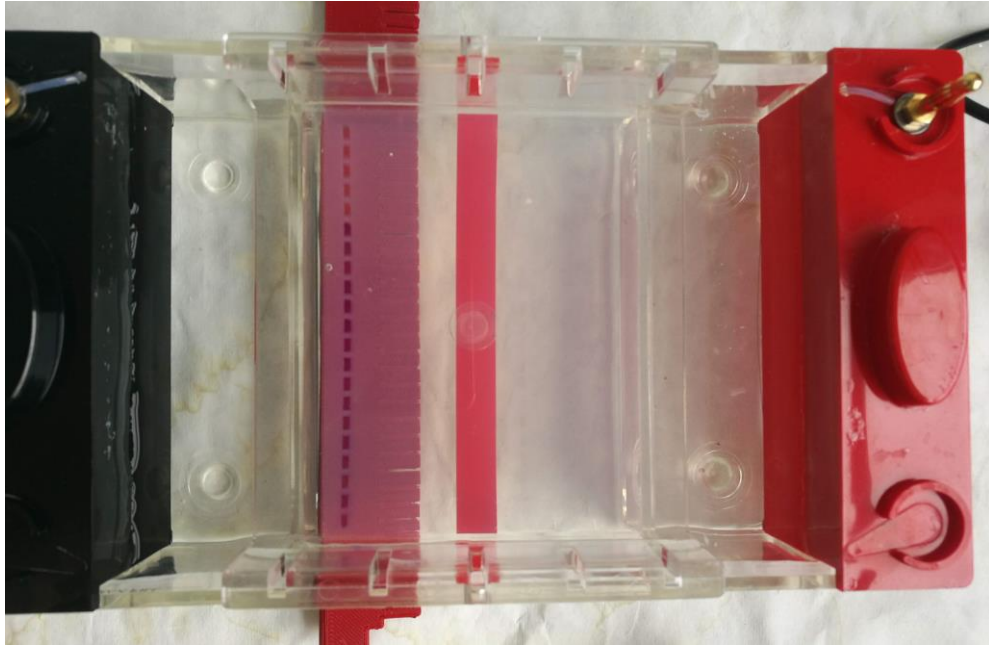
Nejprve bylo nutné v odměrném válci smístit 40 ml 10X TBE koncentrovaného roztoku (elektroforetický pufr) s 360 ml destilované vody. Tím byl získán finální objem 400 ml. Dále z tohoto objemu bylo do odměrného válce potřeba odlít 55 ml vzniklého 1X TBE a ten poté přelit do Erlenmayerovy baňky. Zbylý objem pufru – 345 ml byl nalit do elektroforetické vany. Na analytických vahách bylo odváženo 0,4 g práškové agarózy, jejíž množství se vybírá s ohledem na očekávané délky separovaných fragmentů nukleových kyselin. Agaróza byla rozpuštěna v Erlenmayerově baňce v 55 ml ředěného pufru. Jelikož se agaróza nerozpouští při laboratorní teplotě, byla baňka přikryta víčkem, aby se zabránilo odpaření roztoku a vložena do mikrovlnné trouby. V troubě se nechala přejít mírným varem cca 2 minuty při výkonu 500 W.

Pomocí ochranné gumové chňapky byla horká baňka vyjmuta z trouby a za stálého míchání chlazena na teplotu 50 °C pod proudem tekoucí studené vody. Do roztoku bylo přidáno 1,6 µl interkalačního barviva GelRED, což je látka, která se díky své planární struktuře dokáže interkalovat mezi vlákna DNA a zvýšit tak svou fluorescenci.

Tekutý gel s barvivem byl zamíchán a s co největší plynulostí přelit do připravené formy na gel uzavřené pryžovými bočnicemi. Pokud se v gelu objeví bublinky, musí být odstraněny za pomoci špičky tak, aby byl zachován jeho rovnoměrný povrch bez prasklin. Dále byly do gelu přidány plastové hřebínky, které během tuhnutí gelu vytvoří jamky na DNA. Gel tuhnul cca 15 minut.

Mezitím byl 1 µl izolované DNA pomocí mikropipety smíchán s bromfenolovou modří, která slouží jako tzv. nanášecí pufr, díky němuž se vzorky snáze nanesou do jamek v gelu a je možno kontrolovat jejich rychlost během elektroforézy. Rychlost barviva, jak migruje gelem, je závislá na koncentraci agarózy.

Po zatuhnutí gelu byly plastové hřebínky opatrně vyjmuty a do jamek byly pomocí mikropipety naneseny vzorky DNA smíšeného s nanášecím pufrům viz obrázek 16.



**Obrázek 16 - Nanesené vzorky DNA v elektroforetické vaně (vzorky značeny od spodu SM2 po SM110)**

Elektroforetická vana byla přiklopena bezpečnostním víkem, které bylo připojeno ke zdroji napětí. Po překontrolování polarity byl zdroj nastaven na napětí 70–110 V, proud 250 mA a spuštěn po dobu 35 minut. Po zapnutí vzorky putovaly gelem směrem k červené elektrodě.

Po pětatřiceti minutách, kdy vzorky putovaly gelem, byl gel opatrně přenesen do přístroje Azure c200 od společnosti Azure Biosystém, což je dokumentační systém s kamerou pro snímání fluorescenčních DNA gelů.

## 4.8 Fragmentační analýza organelární DNA

### 4.8.1 Příprava vzorků DNA

Vzorky koncentrované DNA byly po izolaci naředěny ultra čistou vodou na koncentraci 10 ng/μl. Po skladování v mrazicím boxu pro účely následné analýzy byly vyjmuty a rozmrazeny při pokojové teplotě za účelem dalšího pipetování a manipulace. Po použití byl zbylý objem vzorků opět hluboce zamražen.

### 4.8.2 Vytvoření multiplexu pro PCR reakci

Podobu teoreticky vytvořeného primeru je nutné ověřit v praxi testováním na menším souboru vzorků. Na základě výsledků ověření je poté možné přistoupit k dodatečným úpravám koncentrací primerů či teplot annealingu při PCR reakci. Pro tuto práci byly vybrány 2 chloroplastové primery na základě odborného článku (Vendramin et al., 1996).

Pro případ pipetovací chyby je nutné si vytvořit větší objem připraveného multiplexu. V tomto případě byl připraven multiplex, který obsahoval 2 fluorescenčně naznačené primery, které ověří svou variabilitu na 16 vzorcích cpDNA smrku ztepilého viz tabulka 5. Multiplex byl připraven na celkový objem reakce 4 μl. Polovinu jeho objemu tvořil Master mix, dále jednotlivé primery ve svých *forward* (F) a *reverse* (R) formách, kde objem byl zvolen dle dostupné literatury; 1,5 μl tvořila naředěná DNA a zbytek reakce byl doplněn ultračistou vodou ( $d_4H_2O$ ). Aby byla rezerva minimálně 10 % objemu reakce, byl multiplex vyroben pro množství 20 vzorků. Výpočet reakce je možno vidět v tabulce 9. Se všemi komponenty bylo nakládáno v laboratorním boxu, aby se předešlo kontaminaci vzorků či primerů.

**Tabulka 9 - Výpočet reakce při tvorbě multiplexu**

Vzorky	Primer	F/R	1x vzorek [μl]	20x vzorek [μl]
		<b>Pt 71936</b>	F	0,03
		R	0,03	0,6
	<b>Pt 63718</b>	F	0,04	0,8
		R	0,04	0,8
<b>Kontrola Σ</b>			<b>0,14</b>	<b>2,8</b>
<b>Master mix</b>			2	40
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>			0,36	7,2
<b>Kontrola Σ</b>			<b>2,5</b>	<b>50</b>
<b>DNA</b>			1,5	30
<b>Celkem reakce</b>			<b>4</b>	<b>80</b>

Po úvaze a propočítání jednotlivých objemů komponentů reakce (primery, ultra čistá voda, Master mix) je možno přejít k samotné přípravě multiplexu. Všechny komponenty patřící do multiplexu byly napipetovány do jedné zkumavky od společnosti Eppendorf. Poté za účelem homogenizace byla zkumavka pomocí centrifugy odstředěna a následně vortexem smísena. Do 2 připravených stripů o velikosti 1x8 jamek byl napipetován do každé jamky objem 2,5 μl multiplexu a 1,5 μl příslušné DNA. Stripy byly značeny černým fixem a uzavřeny, aby nedošlo k vypaření nebo vylití směsi. Stripy se nakonec vložily do Master cycleru od společnosti Eppendorf viz obrázek 17 a došlo ke spuštění programu pro PCR reakci (tabulka 10).



Obrázek 17 - Parametry PCR amplifikace (přístroj Eppendorf Mastercycler)

#### 4.8.3 PCR reakce

Pro amplifikování (namnožení, zesílení) ohraničených úseků DNA byla použita PCR neboli polymerázová řetězová reakce. Byly použity primery Pt 71936 a Pt 63718, které hybridizují vždy s jedním řetězcem na obou stranách ampifikovaného úseku DNA a termorezistentní DNA polymerázou. Reakce proběhla v MasterCycleru od společnosti Eppendorf.

Jako první krok byla iniciační denaturace, po které následovala denaturace, kdy došlo k rozpadu vodíkových můstků dvoušroubovice DNA na dva řetězce podobně jako při replikaci DNA. Dále je třeba reakční směs po velmi krátkou dobu ochladit (annealing) na teplotu 60 °C, aby byla umožněna hybridizace (dosednutí) primerů. Teplota nesmí být snížena pod hranici annealingu, protože molekuly jednořetězové DNA po ochlazení opět renaturují. Teplota hybridizace je proto klíčová pro výsledek PCR a musí být správně nastavena pro použitý primerový pár. K zahřívání a ochlazování dochází v cyklech. V tomto případě bylo zvoleno cyklů 40. Dalším krokem je extenze a finální extenze, při které dochází k syntéze nových řetězců

a ke vzniku dvojřetězců, jejichž délka odpovídá vzdálenosti primerů. Jejich množství je závislé na počtu cyklů a zvyšuje se s každým cyklem cca dvojnásobně až do doby, kdy jsou téměř všechny nově syntetizované úseky správně dlouhé.

Program, dle kterého běžela PCR byl vybrán s ohledem na primery a druh dřeviny, v tomto případě smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Podrobný program viz tabulka 10.

**Tabulka 10 - Vytvoření programu pro průběh PCR reakce**

Cyklus číslo	Počet opakování	Teplota	Doba trvání
1 iniciální denaturace	1x	95°C	15 min
2 denaturace	40x	95°C	30 s
3 annealing	40x	60°C	45 s
4 extenze	40x	72°C	30 s
5 finální extenze	1x	60°C	30 min
6 uchování	1x	4°C	∞

#### 4.8.4 Fragmentační analýza

Výsledný PCR produkt byl připraven pro fragmentační analýzu v sekvenátoru. Každý vzorek 1 µl PCR produktu byl smíchán s 12,2 µl směsi formamidu a velikostního standardu (500-LIZ), od kterého je poté možné odečítat velikosti vrcholů. Funkce deionizovaného formamidu je zejména snížení teploty tání DNA, aby bylo možné hybridizaci DNA provádět při nižší teplotě. Jedná se o destabilizační činidlo redukující stavbu vodíkových vazeb. S touto látkou je potřeba pracovat rychle, jelikož je těžká a má tendence klesat ke dnu zkumavek. Všechny komponenty je třeba smísit, proto je nutné opět využít vortexu a centrifugy.

Do připraveného nového bloku bylo do každé z 16 jamek napipetováno 12,2 µl směsi formamidu a velikostního standardu, dále byl přidán 1 µl PCR produktu. Blok byl uzavřen speciální folií pro sekvenační přístroj a vložen do cycleru na cyklus o 10 minutách při 95 °C, kdy proběhla denaturace. Okamžitě po dokončení cyklu byl blok vložen na led a poté do sekvenátoru. Sekvenátor po ukončení cyklu vytvořil data, která byla následně interpretována pomocí softwarového nástroje GeneMarker od společnosti SOFTGENETICS.

## 5 Výsledky

Za hlavní výstup bakalářské práce je považována rešeršní analýza zadaného tématu a vytvoření metodického návrhu použití organelárních DNA markerů.

Rešeršní část této bakalářské práce se zabývá mnoha tématy. Zkoumá mimojaderné genomy, jejich evoluci a využití mimojaderné DNA pro studium genetické variability a fylogenetického vývoje u lesních dřevin rodu *Picea* se zaměřením na konkrétní druh smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Dále je tato část bakalářské práce do jisté míry věnována porovnání mimojaderné DNA s DNA jadernou, a to hlavně z hlediska její struktury a dědičnosti.

Pro rešeršní část této práce bylo využito 96 citovaných zdrojů, jimiž jsou hlavně vědecké články převážně z období devadesátých let a přelomu milénia, zaměřené na studium analýzy mimojaderné DNA. V daném období se k analýzám DNA využívalo převážně mikrosatelitů, což je metoda v současnosti již překonaná. V dnešní době se používá hlavně sekvenování DNA. Avšak je třeba zmínit, že metodu analýzy DNA je nutné vybírat s ohledem na to, co je cílem výzkumu a také jakým způsobem proběhne vyhodnocení a interpretace výsledků.

Dále byla nad rámec zadání prakticky ověřena funkčnost navržené metodiky analýzy chloroplastové DNA na chloroplastových markerech 16 jedincích smrku ztepilého.

## 5.1 Měření parametrů izolované DNA

U všech 16 vzorků se podařilo izolovat DNA a následně změřit její koncentraci a čistotu (tabulka 11). Koncentrace DNA se pohybovala nejčastěji v rozmezí 10 až 12 ng/μl a poměrový koeficient 260/280 měl nejčastěji hodnotu okolo 1,8 což je v rozmezí (od 1,7 do 1,9), které je považováno za ideální stav, kdy se hodnota koncentrace DNA jeví jako neznečištěná jinými látkami (RNA, bílkovinami atd.). Ze všech testovaných vzorků nejvyšší koncentraci 90,0 ng/μl a poměrový koeficient 260/280 (1,83), měl vzorek SM108.

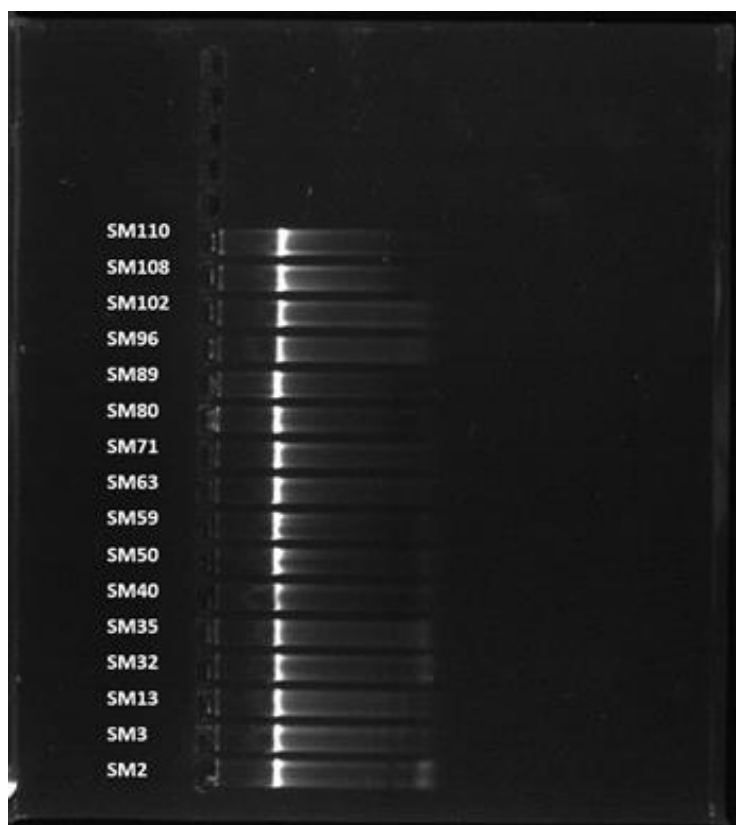
Tabulka 11 - Změřené koncentrace a čistoty izolované DNA

Pořadové číslo vzorku	Označení vzorku	Koncentrace nukleové kys. [ng/μl]	Poměrový koeficient 260/280 nm
1	SM2	11,2	1,85
2	SM3	11,3	2,23
3	SM13	10,3	1,99
4	SM32	10,7	1,80
5	SM35	11,0	2,02
6	SM40	16,7	1,93
7	SM50	11,7	1,93
8	SM59	59,4	1,88
9	SM63	12,6	1,81
10	SM71	80,7	1,49
11	SM80	65,0	1,30
12	SM89	11,7	1,75
13	SM96	21,8	1,88
14	SM102	85,0	1,48
15	SM108	90,0	1,83
16	SM110	94,0	2,12



## 5.2 Elektroforetická separace

Elektroforéza byla provedena zejména za účelem ověření výsledků spektrofotometrického měření, tedy zjištění koncentrace a čistoty DNA. Fotografie gelu (obrázek 18) dokladuje přítomnost DNA u všech vzorků a obdobná míra intenzity UV světelného odrazu potvrzuje správnost zjištěné koncentrace při předchozím měření.



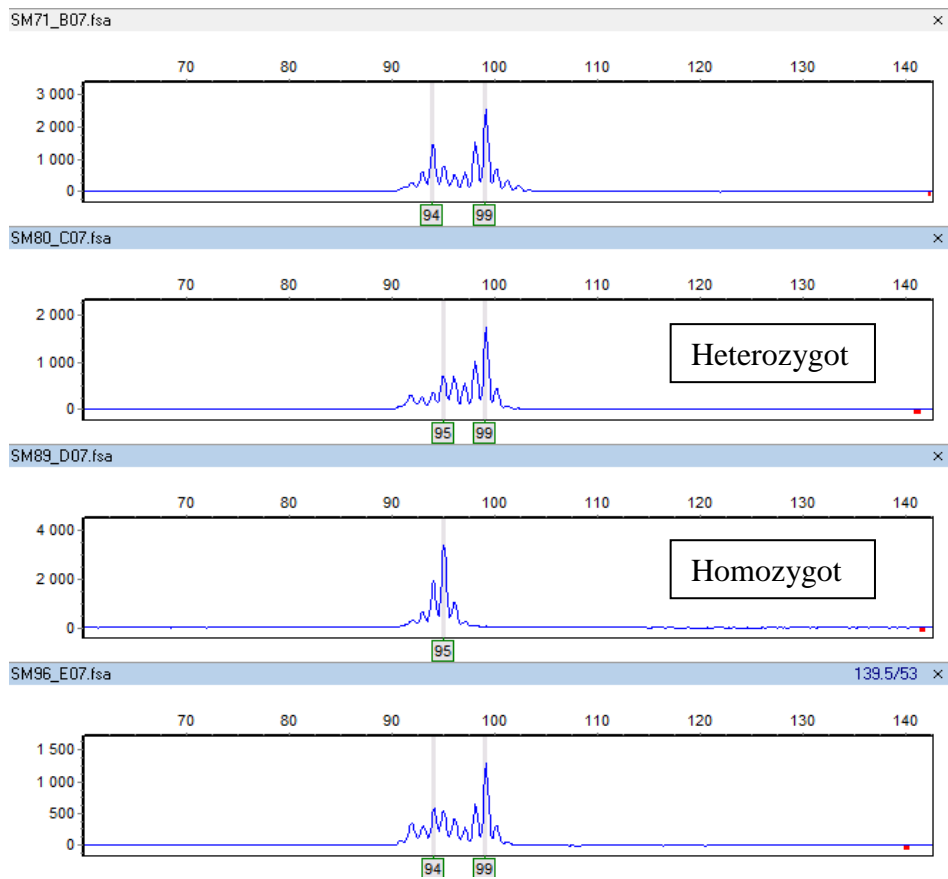
Obrázek 18 - Snímek vzorků na gelu po elektroforéze pořízeno dokumentačním systémem Azure c200

## 5.3 Posouzení datového setu

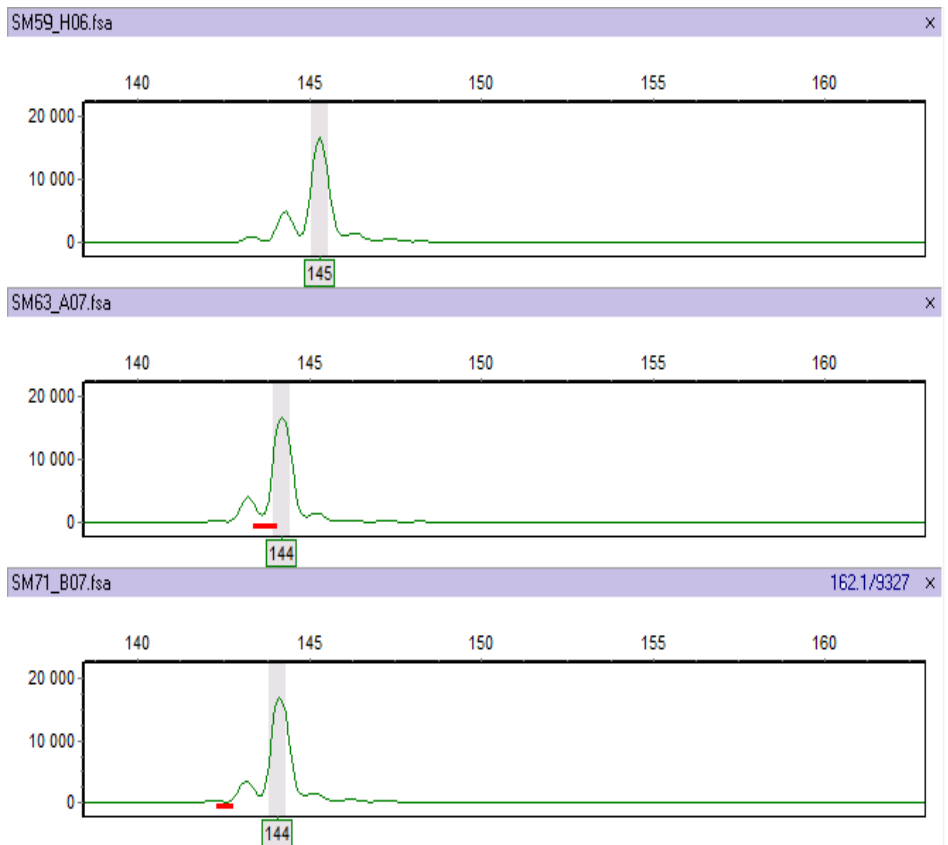
### 5.3.1 Detekovaný polymorfismus

Jako analytický nástroj na zpracování dat fragmentační analýzy chloroplastové DNA byl použit software GeneMarker od společnosti SOFTGENETICS. Tento nástroj umožňuje zpracování výstupních dat ze sekvenátoru. Na obrázku 19 je ukázka vyhodnocení dat pomocí softwaru GeneMarker, konkrétně se jedná o 4 vzorky (odshora – SM71, SM80, SM89 a SM96), u kterých byl použit primer Pt63718. U každé křivky je patrný alespoň jeden vrchol (peak). U vzorku SM89 můžeme říci, že se jedná o homozygota, jelikož má vylišený pouze 1 vrchol. Ostatní 3 vzorky mají vždy vrcholy 2 o konkrétních délkách, jedná se tedy o heterozygotní jedince. Vrcholy nemusejí být vždy jasné, protože se někdy stává, že DNA polymeráza tzv. sklouzává při replikaci repetitivních sekvencí a tím dojde k expanzi mikrosatelitových repeticí.

Naproti tomu na obrázku 20 můžeme pozorovat ukázkou vyhodnocení dat na 3 vzorcích (od shora – SM59, SM63, SM71), u kterých byl použit primer Pt71936. U všech třech vzorků se jedná o homozygoty, jelikož mají vždy jen jeden vrchol, avšak s různými délkami párů bazí



Obrázek 19 - Ukázka zpracování dat (primer Pt63718) softwarem GeneMarker



Obrázek 20 - Ukázka zpracování dat (primer Pt71936) softwarem GeneMarker

### 5.3.2 Genetická struktura a diference

Pro ověření funkčnosti metodiky bylo testováno 16 vzorků smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.) pomocí dvou chloroplastových markerů. Oba zájmové lokusy vykazují polymorfismus napříč všemi zájmovými vzorky.

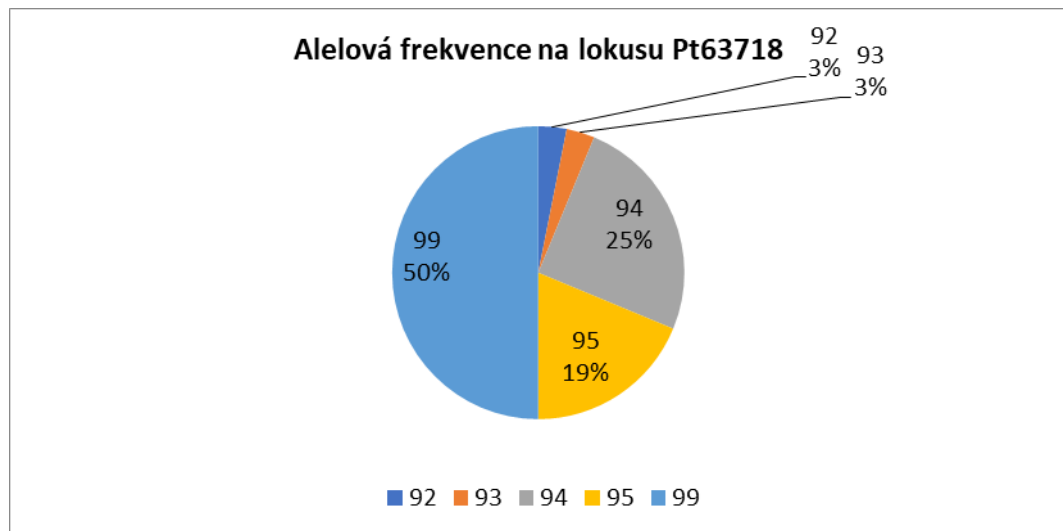
Tabulka 12 - Výsledné alely podle adjustace z GeneMarkeru

Vzorek	Pt63718		Pt71936	
SM2	94	99	144	144
SM3	95	99	145	145
SM13	95	99	145	145
SM32	94	99	145	145
SM35	92	99	145	145
SM40	94	99	145	146
SM50	94	99	145	145
SM59	94	99	145	145
SM63	93	99	144	144
SM71	94	99	144	144
SM80	95	99	145	145
SM89	95	95	145	145
SM96	94	99	145	145
SM102	94	99	145	145
SM108	95	99	145	145
SM110	99	99	145	145

V tabulce 12 jsou uvedeny výsledné alely jednotlivých vzorků po adjustaci v softwaru GeneMarker od společnosti SOFTGENETICS. Při pohledu do tabulky 12 je také patrné, že na lokusu Pt63718 jedinci SM2, SM32, SM40, SM50, SM59, SM71, SM96, SM102 jsou identičtí, jejich alely jsou 94 a 99 bp, jedná se tedy o heterozygoty. Stejný výsledek vyšel u vzorků SM3, SM13, SM80, SM108, u kterých je pouze rozdíl v tom, že šlo o alely dlouhé 95 a 99 párů bází. Na stejném lokusu se prokázaly i 2 homozygoti, a to u vzorku SM89 na alelách 95 a 95 bp a dále u vzorku SM110 na alelách 99 a 99 bp. Za vzácné lze považovat alelu 93 bp u vzorku SM63 a alelu 92 u vzorku SM35.

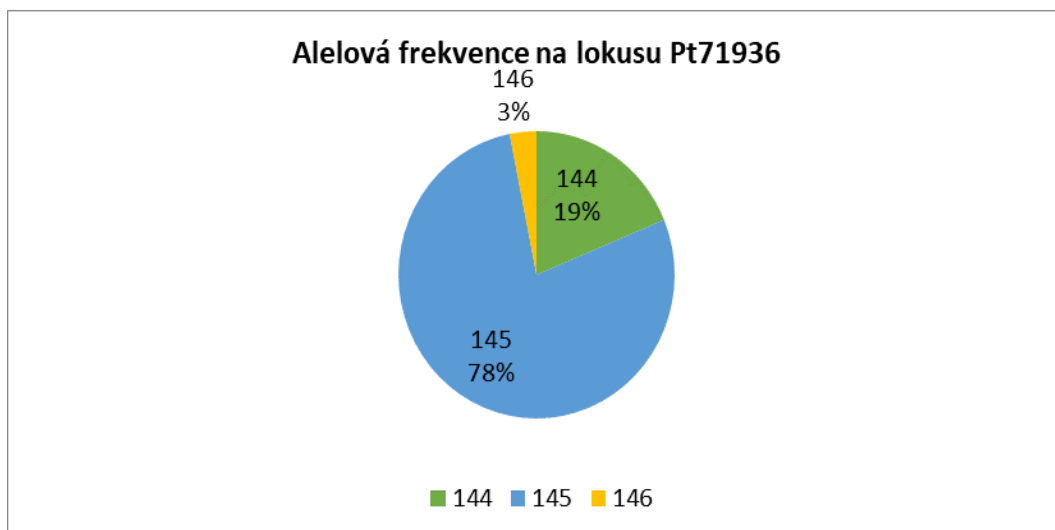
Lokus Pt71936 nevykazuje takový polymorfismus jako předešlý, což je vidět na grafu 3. U většiny vzorků jde o homozygoty s převahou alel 145 a 145 bp, to se týká vzorků SM3, SM13, SM 32, SM35, SM50, SM59, SM80, SM89, SM96, SM102,

SM108, SM110. Další vzorky SM2, SM63 a SM71 se ukázaly také jako homozygoti, ale na alelách 144 a 144 bp. Nejzajímavější je vzorek SM40, který je heterozygot s alelami 145 a 146 bp.



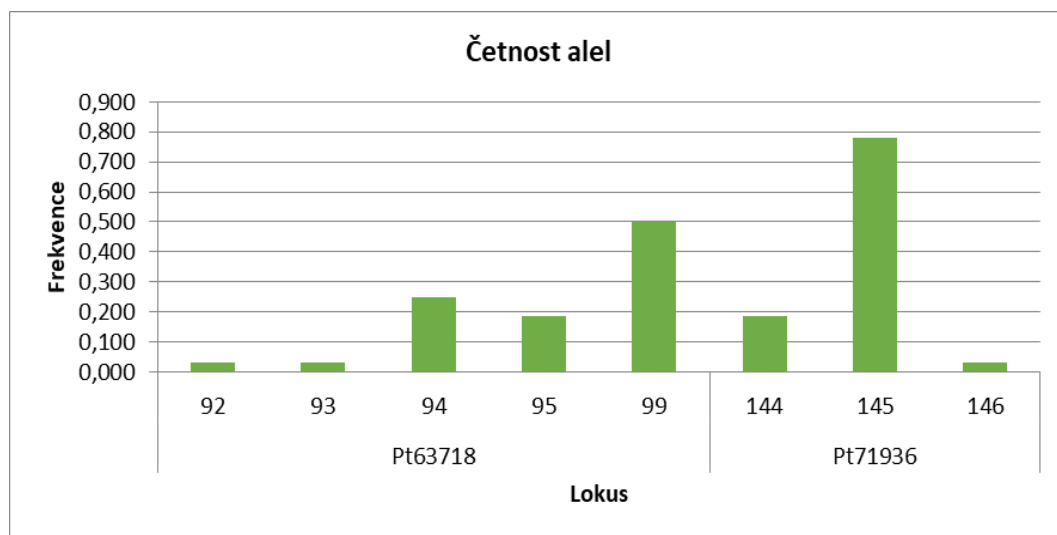
**Graf 1 - Procentuální alelová frekvence na lokusu Pt63718, vytvořeno v Excelu doplňkem GenAIEx**

Graf 1 představuje grafické znázornění procentuálního zastoupení jednotlivých alel na lokusu Pt63718. Graf shrnuje četnost v procentuálním zastoupení alel v rámci testovaných vzorků. Na lokusu se nacházejí alely v rozmezí hodnot od 92 do 99 páru bází, kdy nejčastěji je zastoupena alela na pozici 99 páru bází s 50% zastoupením. Tento lokus se s celkovým počtem 5 nalezených alel jeví jako velmi polymorfní v závislosti na charakteru užitého markeru.



**Graf 2 - Procentuální alelová frekvence na lokusu Pt71936, vytvořeno v Excelu doplňkem GenAIEx**

Méně, avšak stále polymorfní je lokus Pt71936 graficky vyobrazený do koláčového diagramu v grafu 2. Tento lokus obsahuje alely v rozmezí hodnot od 144 do 146 páru bází. Nejvíce zastoupená je alela 145 o celkové procentuální četnosti 78 %.



**Graf 3 - Četnost alel na obou vybraných lokusech, vytvořeno v Excelu doplňkem GenAIEx**

Jak je vidět z tabulky 12 a grafu 3 délková variabilita mezi mikrosatelitovými lokusy nebyla příliš velká, ale prokázala se. To znamená, že se na daných lokusech pravděpodobně nejedná u všech vzorků o geneticky příbuzné, nicméně tato práce si neklade za cíl na testovaném souboru vzorku zjistit genetickou diverzitu.

## 6 Diskuze

Smrk ztepilý (*Picea abies* (L.) H. Karst.) je ekonomicky a ekologicky jedním z nejdůležitějších jehličnanů v Evropě, a proto znalost genetické variability druhu a populační diferenciace je pro jeho správný management obzvláště důležitá.

Organelární genomy mohou být zdrojem zajímavých DNA markerů za účelem studia genetické variability rostlin (Jeandroz et al., 2002). V porovnání s jadernými genomy jejich haploidie a uniparentální přenos vede, zejména pokud jsou děděny maternálně, k vyšší interpopulační diferenciaci (Petit, Kremer, & Wagner, 1993). U smrku ztepilého dochází k maternální dědičnosti mtDNA, zatímco cpDNA je přenášena skrze samčí gametu, tedy paternálně.

Nicméně paternálně přenosná cpDNA dle autorů Sperisena a kol. (2001) analyzovaná pomocí mikrosatelitových markerů od Vendramina a kol. (2000) vykazuje mnohem nižší stupeň populační diferenciace ( $G_{ST}=0,078$ ) než téměř identický vzorkový set s maternálně přenosnou mtDNA a markerem *nad1* intron 2 ( $G_{ST}=0,676$ ). Nicméně další studie u jehličnanů potvrzují, že delimitace druhů, i když zdaleka ne dokonalá, je ve většině případů účinnější s cpDNA markery než s mtDNA markery (Du et al., 2009).

Organelární genomy pro nás mohou být užitečným nástrojem za účelem porozumění populační diferenciaci a migraci, což jsou klíčové body pro vývoj účinných strategií v ochraně genetických zdrojů (Newton, Allnutt, Gillies, Lowe, & Ennos, 1999).

Ověření metodiky na menším souboru vzorků ukazuje, že vybrané chloroplastové primery jsou schopné amplifikovat mikrosatelitové regiony chloroplastové DNA smrku ztepilého. Dále tato práce dokládá, že na zkoumaných vzorcích je lokus Pt63718 polymorfnější, jelikož vylišuje 5 různých alel na rozdíl od lokusu Pt71936, který vylišuje alely 3. Z výsledků lze také zjistit velikost alel v párech bazí. Tato práce si neklade za cíl přímo zjištění genetické variability, avšak pokud se ověřená metodika použije na větší soubor vzorků, pravděpodobně bude účinným nástrojem pro zjištění genetické variability populací smrku ztepilého na daném území. Analýza mikrosatelitových chloroplastových markerů dle navržené metodiky může sloužit i pro zkoumání evolučního vývoje vybraných druhů dřevin a jejich příbuznosti v rámci celé čeledi jako například u Lin a kol. (2010).

Kombinace více markerů, jež zkoumají odlišné části dostupných rostlinných genomů (cpDNA, mtDNA, popř. nDNA) se jeví jako správná cesta k determinaci genetického statusu zkoumaných jedinců, jelikož zvýrazní různé aspekty genetické diverzity. Proto se nabízí sloučit obě navrhované metodiky v jednu a vytvořit multiplex s chloroplastovými i mitochondriálními primery, jako již obdobně publikoval Maghuly a kol. (2006). Chloroplastové markery tak budou sloužit např. k monitoringu pylové migrace a mitochondriální markery ke zkoumání migrace semen.

Jelikož většina publikovaných studií týkajících se organelárních markerů nebyla prováděna ve Střední Evropě, je vhodné do budoucna organelární markery aplikovat při studiích genetické diverzity smrku ztepilého právě tam. Poslouží tak jako pomocný ukazatel pro lesní management.



## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat podrobnou literární rešerši zaměřenou na možnosti analýzy organelární DNA a využití této informace pro studium genetické struktury, variability a fylogenetického vývoje lesních dřevin u konkrétního druhu smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.). Tento cíl byl splněn a práce se zaměřuje zejména na chloroplastovou a mitochondriální DNA. Bylo prostudováno více než 50 odborných článků a publikací se zaměřením na mimojaderné genomy a jejich využití. Součástí bakalářské práce je také vytvoření dvou teoretických metodik analýzy mitochondriální a chloroplastové DNA a ověření jedné z nich. Metodika chloroplastové DNA byla navržena na základě vybraných parametrů po vzoru ověřených metodik z vědeckých publikací zejména od Vendramina a kol. (1996). Dále byla prakticky ověřena v molekulárně-genetické laboratoři FLD pomocí dvou vybraných markerů nad rámec zadání práce. U mitochondriální DNA byla navržena metodika na základě publikace od Gugerliho a kol. (2001) a je v této práci teoreticky popsána. Minimální počet zdrojů citovaných v rešerši byl v cílech práce stanoven na 50. Tento cíl byl výrazně překročen a celá práce čítá 111 citovaných zdrojů.

## 8 Seznam literatury a použitých zdrojů

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Raff, M., Lewis, J., ... Walter, P.** (2014). *Essential cell biology. Essential Cell Biology* (4.). New York: Garland Science.
- Bastien, D., Favre, J. M., Collignon, A. M., Sperisen, C., & Jeandroz, S.** (2003). Characterization of a mosaic minisatellite locus in the mitochondrial DNA of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Theoretical and Applied Genetics*, *107*(3), 574–580. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1284-2>
- Besnard, G., Acheré, V., Rampant, P. F., Favre, J. M., & Jeandroz, S.** (2003). A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology Notes*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00456.x>
- Birky, C. W.** (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(25), 11331–11338. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11331>
- Bogorad, L.** (1975). Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science*, *188*(4191), 891–898. <https://doi.org/10.1126/science.1138359>
- Bouillé, M., Senneville, S., & Bousquet, J.** (2011). Discordant mtDNA and cpDNA phylogenies indicate geographic speciation and reticulation as driving factors for the diversification of the genus *Picea*. *Tree Genetics and Genomes*. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0349-z>
- Burger, G., Gray, M. W., Forget, L., & Lang, B. F.** (2013). Strikingly Bacteria-Like and Gene-Rich Mitochondrial Genomes throughout Jakobid Protists. *Genome Biology and Evolution*, *5*(2), 418–438. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt008>
- Byrne, M., Moran, G. F., & Tibbits, W. N.** (1993). Restriction Map and Maternal Inheritance of Chloroplast DNA in *Eucalyptus nitens*. *Journal of Heredity*, *84*(3), 218–220. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111322>
- Campbell, N. A., Williamson, B., & Heyden, R. J.** (2006). *Biology : exploring life*. Boston: Pearson/Prentice Hall.
- Cavalier-Smith, T.** (1975). The origin of nuclei and of eukaryotic cells. *Nature*, *256*(5517), 463–468. <https://doi.org/10.1038/256463a0>
- Cvrčková, H., Máchová, P., Dostál, J., & Malá, J.** (2011). Sledování genetické proměnlivosti chlumního ekotypu smrku ztepilého pomocí RAPD. *Zprávy Lesnického Výzkumu*, *56*(2), 137–143.
- de Roos, A. D. G.** (2006). The Origin of the Eukaryotic Cell Based on Conservation of Existing Interfaces. *Artificial Life*, *12*(4), 513–523.

<https://doi.org/10.1162/artl.2006.12.4.513>

- Demesure, B., Sodzi, N., & Petit, R. J.** (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, *4*(1), 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x>
- Dering, M., Misiorny, A., Lewandowski, A., & Korczyk, A.** (2012). Genetic and historical studies on the origin of Norway spruce in Białowieża Primeval Forest in Poland. *European Journal of Forest Research*, *131*(2), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0510-8>
- Douce, R.** (1985). *Mitochondria in higher plants : structure, function, and biogenesis* (1. vyd.). Academic Press.
- Du, F. K., Petit, R. J., & Liu, J. Q.** (2009). More introgression with less gene flow: chloroplast vs. mitochondrial DNA in the *Picea asperata* complex in China, and comparison with other Conifers. *Molecular Ecology*, *18*(7), 1396–1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04107.x>
- Dumolin, S., Demesure, B., & Petit, R. J.** (1995). Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics*, *91*(8), 1253–1256. <https://doi.org/10.1007/BF00220937>
- Eriksson, G., Ekberg, I., & Clapham, D.** (2006). *An introduction to Forest Genetics* (2. vyd.). Upsala: Genetic Center Department of Plant Biology and Forest Genetics, SLU.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., & Pace, N. R.** (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, *170*(8), 3584–3592. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3584-3592.1988>
- Glöckner, G., Rosenthal, A., & Valentin, K.** (2000). The Structure and Gene Repertoire of an Ancient Red Algal Plastid Genome. *Journal of Molecular Evolution*, *51*(4), 382–390. <https://doi.org/10.1007/s002390010101>
- Gugerli, F., Sperisen, C., Buchler, U., Magni, F., Geburek, T., Jeandroz, S., & Senn, J.** (2001). Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Molecular Ecology*, *10*(5), 1255–1263. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01279.x>
- Hipkins, V. D., Krutovskii, K. V., & Straws, S. H.** (1995). Organelle Genomes in Conifers : Structure , Evolution , and Diversity. *Forest Genetics*, *1*(4), 179–189. Získáno z <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.476.8224&rep=rep1&type=pdf>
- Holasová, S., Radilová, H., & Bunčeka, M.** (2006). *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. Karolinum. Získáno z <https://www.alescenek.cz/zbozi/82693/prakticka->

- Jaramillo-Correa, J. P., Bousquet, J., Beaulieu, J., Isabel, N., Perron, M., & Bouillé, M.** (2003). Cross-species amplification of mitochondrial DNA sequence-tagged-site markers in conifers: the nature of polymorphism and variation within and among species in *Picea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8), 1353–1367. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1174-z>
- Jeandroz, S., Bastien, D., Chandelier, A., Du Jardin, P., & Favre, J. M.** (2002). A set of primers for amplification of mitochondrial DNA in *Picea abies* and other conifer species. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 389–392. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00271.x>
- Jelínek, J., & Zicháček, V.** (2014). *Biologie pro gymnázia*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc s.r.o.
- Jelínek, R., Dostál, M., Halašková, M., Maňáková, E., Peterka, M., Zemanová, Z., ... Zemanová, Z.** (2007). *Histologie embryologie. Skriptum*. Praha. Získáno z <http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>
- Jin, S., & Daniell, H.** (2015). The Engineered Chloroplast Genome Just Got Smarter. *Trends in Plant Science*, 20(10), 622–640. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.004>
- John, P., & Whatley, F. R.** (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*, 254(5500), 495–498. <https://doi.org/10.1038/254495a0>
- Jurásek, A., Leugner, J., & Martincová, J.** (2007). *Specifika pěstování a využití materiálu smrku ztepilého Picea abies (L.) KARST. pro horské oblasti. Lesnický průvodce*. Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
- Kalina, T., & Váňa, J.** (2005). *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii* (1.). Praha: Karolinum. Získáno z [https://www.cupress.cuni.cz/ink2\\_ext/index.jsp?include=podrobnosti&id=216343](https://www.cupress.cuni.cz/ink2_ext/index.jsp?include=podrobnosti&id=216343)
- Khan, A., Khan, L., & Asif, H.** (2010). Current trends in chloroplast genome research. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3494–3500. <https://doi.org/10.5897/AJBx09.057>
- Kincl, L., Kincl, M., & Jakrlová, J.** (2006). *Biologie rostlin : pro 1. ročník gymnázií*. Fortuna.
- Kleine, T., Maier, U. G., & Leister, D.** (2009). DNA Transfer from Organelles to the Nucleus: The Idiosyncratic Genetics of Endosymbiosis. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 115–138. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092119>
- Kočárek, E.** (2008). *Genetika*. Praha: Scientia.
- Kohoutová, M., & Otová, B.** (2017). *Lékařská biologie a genetika II. díl*. Praha: Karolinum.

- Kondo, T., Tsumura, Y., Kawahara, T., & Okamura, M.** (1998). Paternal Inheritance of Chloroplast and Mitochondrial DNA in Interspecific Hybrids of *Chamaecyparis* spp. *Ikushugaku zasshi*, 48(2), 177–179. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.48.177>
- Koolman, J., & Röhm, K.-H.** (2012). *Barevný atlas biochemie* (4.). Praha: Grada.
- Kormutak, A., Galgoci, M., Sukenikova, D., Bolecek, P., Libantova, J., & Gómóry, D.** (2018). Maternal inheritance of chloroplast DNA in *Pinus mugo* Turra: a case study of *Pinus mugo* × *Pinus sylvestris* crossing. *Plant Systematics and Evolution*, 304(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1449-0>
- Latta, R. G., Linhart, Y. B., Fleck, D., & Elliot, M.** (1998). Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. *Source: Evolution Evolution*.
- Lavrov, D. V., & Pett, W.** (2016). Animal Mitochondrial DNA as We Do Not Know It: mt-Genome Organization and Evolution in Nonbilaterian Lineages. *Genome Biology and Evolution*, 8(9), 2896–2913. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw195>
- Lennarz, W. J., & Lane, M. D.** (2013). *Encyclopedia of biological chemistry* (2.). Získáno z [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=ykUu06JQrjC&oi=fnd&pg=PP2&q=Lennarz,W.J.,+Lane,+M.D.+Encyclopedia+of+Biological+Chemistry&ots=eGuTvRvViUZ&sig=SHLc3RnftGQcTbMdw4cE6v-kGrg&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=ykUu06JQrjC&oi=fnd&pg=PP2&q=Lennarz,W.J.,+Lane,+M.D.+Encyclopedia+of+Biological+Chemistry&ots=eGuTvRvViUZ&sig=SHLc3RnftGQcTbMdw4cE6v-kGrg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Lin, C.-P., Huang, J.-P., Wu, C.-S., Hsu, C.-Y., & Chaw, S.-M.** (2010). Comparative Chloroplast Genomics Reveals the Evolution of Pinaceae Genera and Subfamilies. *Genome Biology and Evolution*, 2, 504–517. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq036>
- Litkowiec, M., Dering, M., & Lewandowski, A.** (2009). Utility of two mitochondrial markers for identification of *Picea abies* refugial origin. *Dendrobiology*, 61, 65–71.
- Livingstone Bell, P. J.** (2001). Viral Eukaryogenesis: Was the Ancestor of the Nucleus a Complex DNA Virus? *Journal of Molecular Evolution*, 53(3), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s002390010215>
- Lockwood, J. D., Aleksić, J. M., Zou, J., Wang, J., Liu, J., & Renner, S. S.** (2013). A new phylogeny for the genus *Picea* from plastid, mitochondrial, and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 717–727. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.004>
- Lowe, A., Harris, S., & Ashton, P.** (2004). *Ecological genetics : design, analysis, and application*. Blackwell Pub. Získáno z <https://www.wiley.com/en-us/Ecological+Genetics%3A+Design%2C+Analysis%2C+and+Application-p-9781405100335>
- Lunt, D. H., Whipple, L. E., & Hyman, B. C.** (1998). Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular ecology*, 7(11), 1441–1455. Získáno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819900>

- Maghuly, F., Burg, K., Pinsker, W., Nittinger, F., Praznik, W., & Fluch, S.** (2008). Short Note: Development of Mitochondrial Markers for Population Genetics of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Silvae Genetica*, 57(1–6), 41–44. <https://doi.org/10.1515/sg-2008-0007>
- Maghuly, F., Nittinger, F., Pinsker, W., Praznik, W., & Fluch, S.** (2007). Differentiation among Austrian populations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] assayed by mitochondrial DNA markers. *Tree Genetics & Genomes*, 3(3), 199–206. <https://doi.org/10.1007/s11295-006-0055-z>
- Maghuly, F., Pinsker, W., Praznik, W., & Fluch, S.** (2006). Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Forest Ecology and Management*, 222(1–3), 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.10.025>
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S.** (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*, 16(14), R551–R560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>
- Mejnartowicz, M.** (1991). Inheritance of chloroplast DNA in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(4), 477–480. <https://doi.org/10.1007/BF00588602>
- Ministerstvo zemědělství.** (2018). *Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2017*. Praha. Získáno z [http://eagri.cz/public/web/file/609179/Zprava\\_o\\_stavu\\_lesa\\_2017.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/609179/Zprava_o_stavu_lesa_2017.pdf)
- Mitton, J. B., Kreiser, B. R., & Latta, R. G.** (2000). Glacial refugia of limber pine (*Pinus flexilis* James) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 9(1), 91–97. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00840.x>
- Mogensen, H. L.** (1996). The Hows and Whys of Cytoplasmic Inheritance in Seed Plants. *American Journal of Botany*, 83(3), 383. <https://doi.org/10.2307/2446172>
- Moreira, D., & López-García, P.** (1998). Symbiosis Between Methanogenic Archaea and  $\delta$ -Proteobacteria as the Origin of Eukaryotes: The Syntrophic Hypothesis. *Journal of Molecular Evolution*, 47(5), 517–530. <https://doi.org/10.1007/PL00006408>
- Musil, I., & Hámerník, J.** (2003). *Lesnická dendrologie 1, Jehličnaté dřeviny*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Neale, D. B., Marshall, K. A., & Sederoff, R. R.** (1989). Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9347–9349. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9347>
- Neale, D. B., & Sederoff, R. R.** (1989). Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/BF00266189>
- Newton, A. C., Allnutt, T. R., Gillies, A. C. M., Lowe, A. J., & Ennos, R. A.** (1999).

- Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(4), 140–145.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01555-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01555-9)
- Nielsen, B. L., & Stewart, M. A.** (2016). Plant mitochondrial DNA. *Frontiers in Bioscience*. <https://doi.org/10.2741/4531>
- Obidowicz, A., Ralska-Jasiewiczowa, M., Kupryjanowicz, M., Szczepanek, K., Latalowa, M., & Nalepka, D.** (2004). *Picea abies* (L.) H. Karst. - Spruce.
- Palmer, J. D., Adams, K. L., Cho, Y., Parkinson, C. L., Qiu, Y. L., & Song, K.** (2000). Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 6960–6966. Získáno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860957> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC34370>
- Palmer, J. D., & Herbon, L. A.** (1988). Plant mitochondrial DNA evolved rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution*.  
<https://doi.org/10.1007/BF02143500>
- Palmer, J. D., & Stein, D. B.** (1986). Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Current Genetics*, 10(11), 823–833.  
<https://doi.org/10.1007/BF00418529>
- Petit, R. J., & Excoffier, L.** (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.02.011>
- Petit, R. J., Kremer, A., & Wagner, D. B.** (1993). Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity*. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.188>
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N. J., McNicol, J. W., Forrest, G. I., Cottrell, J., & Powell, W.** (1998). Gene-pool variation in caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings. Biological sciences*, 265(1407), 1697–1705.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0491>
- Qiao, C. Y., Ran, J. H., Li, Y., & Wang, X. Q.** (2007). Phylogeny and biogeography of *Cedrus* (Pinaceae) inferred from sequences of seven paternal chloroplast and maternal mitochondrial DNA regions. *Annals of Botany*, 100(3), 573–580.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm134>
- Quinn, C. J., Price, R. A., & Gadek, P. A.** (2002). Familial Concepts and Relationships in the Conifer Based on *rbcL* and *matK* Sequence Comparisons. *Kew Bulletin*, 57(3), 513. <https://doi.org/10.2307/4110984>
- Radetzky, R.** (1990). Analysis of mitochondrial DNA and its inheritance in *Populus*. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/BF00309912>
- Rajora, O. P., & Dancik, B. P.** (1992). Chloroplast DNA inheritance in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84(3–4), 280–285.  
<https://doi.org/10.1007/BF00229483>

- Rhawn, J.** (2009). Genetics and Evolution of Life From Other Planets: Viruses, Bacteria, Archae, Eukaryotes, Introns, Transposons, Exons, Conserved Genes, Silent Genes, Regulatory Genes, Whole Genome Duplication, Gene Expression, and Evolutionary Metamorphosis. *Cosmology*, 1(150–200). Získáno z <http://cosmology.com/Cosmology3.html>
- Rothman, R. H.** (2010). *Determination of DNA Concentration and Purity by Ultraviolet Spectrophotometry. Genetic Engineering Lab Manual*. Získáno z <https://people.rit.edu/rhrsbi/GEPages/LabManual.html>
- Sapp, J.** (2003). *Genesis: The Evolution of Biology. Genesis: The Evolution of Biology*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195156195.001.0001>
- Scheffler, I. E.** (1999). *Mitochondria*. Wiley-Liss. Získáno z [https://books.google.cz/books?id=zzk5uCWRAiAC&dq=ISBN+0-471-19422-0.&hl=cs&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.cz/books?id=zzk5uCWRAiAC&dq=ISBN+0-471-19422-0.&hl=cs&source=gbs_navlinks_s)
- Schubert, R., Mueller-Starck, G., & Riegel, R.** (2001). Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1223–1231. <https://doi.org/10.1007/s001220000501>
- Sewell, M. M., Qiu, Y.-L., Parks, C. R., & Chase, M. W.** (1993). Genetic Evidence for Trace Paternal Transmission of Plastids in *Liriodendron* and *Magnolia* (Magnoliaceae). *American Journal of Botany*, 80(7), 854. <https://doi.org/10.2307/2445605>
- Slávik, M.** (2004). *Lesnická dendrologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Sperisen, C., Büchler, U., Gugerli, F., Mátyás, G., Geburek, T., & Vendramin, G. G.** (2001). Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: Application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01180.x>
- Sperisen, C., Büchler, U., & Mátyás, G.** (1998). Genetic Variation of Mitochondrial DNA Reveals Subdivision of Norway Spruce (*Picea Abies* (L.) Karst.). In *Molecular Tools for Screening Biodiversity* (s. 413–417). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6\\_74](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6_74)
- Suda, J.** (2009). Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? *Živa*, 5, 204–208.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J.** (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17(5), 1105–1109. <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
- Taiz, L., & Zeiger, E.** (2015). *Plant Physiology (Sixth Edition)*. Sinauer Associates.
- Tollefsrud, M. M., Kissling, R., Gugerli, F., Johnsen, Ø., Skrøppa, T., Cheddadi, R., ... Sperisen, C.** (2008). Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: Combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen. *Molecular Ecology*, 17(18), 4134–4150.



<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03893.x>

- Tollefsrud, M. M., Sønstebo, J. H., Brochmann, C., Johnsen, Skrøppa, T., & Vendramin, G. G.** (2009). Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.16>
- Tomášková, I., & Kubásek, J.** (2016). *Fyziologie lesních dřevin I. - Fyziologie, produkce a stresy rostlin*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Tomášková, I., & Kubásek, J.** (2017). *Fyziologie lesních dřevin II. - Růst, vývoj a rozmnožování*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Tomioka, N., & Sugiura, M.** (1983). The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Molecular & general genetics : MGG*, 191(1), 46–50. Získáno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6412038>
- Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Hiratsuka, J., Shibata, M., Wakasugi, T., & Sugiura, M.** (1992). Chloroplast DNA of black pine retains a residual inverted repeat lacking rRNA genes: nucleotide sequences of trnQ, trnK, psbA, trnI and trnH and the absence of rps16. *MGG Molecular & General Genetics*, 232(2), 206–214. <https://doi.org/10.1007/BF00279998>
- Turmel, M., Otis, C., & Lemieux, C.** (1999). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), 10248–10253. Získáno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468594>
- Tuusa, J.** (2001). *Human DNA polymerase [epsilon] : expression, phosphorylation and protein-protein interactions*. Oulun yliopisto. Získáno z <http://jultika.oulu.fi/Record/isbn951-42-6581-5>
- Vaidya, A. B.** (2014). The Mitochondrion. In *Molecular Approaches to Malaria* (s. 234–252). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555817558.ch12>
- Vella, F.** (1988). Harper's Biochemistry (21st Edition). *Biochemical Education*, 16(1), 50. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(88\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(88)90029-5)
- Vendramin, G. G., Anzidei, M., Madaghiele, A., Sperisen, C., & Bucci, G.** (2000). Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 43(1), 68–78. <https://doi.org/10.1139/g99-093>
- Vendramin, G. G., Lelli, L., Rossi, P., & Morgante, M.** (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00353.x>
- Voet, D., Kotyk, A., Geis, I., Pecák, M., & Voet, J. G.** (1995). *Biochemie* (1.). Praha: Victoria Publishing.

- Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti.** (2018). *Tisková zpráva - Rozsah kůrovcové kalamity představuje vysoké riziko pro rok 2019*. Praha.
- Wagner, D. B.** (1992). Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forests*. <https://doi.org/10.1007/BF00120653>
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T., & Sugiura, M.** (1994). Loss of all ndh genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9794–9798. Získáno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937893>
- Wang, X. R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., & Szmidt, A. E.** (1999). Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast rbcL, matK, rpl20-rps18 spacer, and trnV intron sequences. *American Journal of Botany*, 86(12), 1742–1753. <https://doi.org/10.2307/2656672>
- Watson, J.** (1966). Molecular Biology of the Gene James D. Watson. *BioScience*, 16(3), 209–209. <https://doi.org/10.2307/1293525>
- Wei, X. X., & Wang, X. Q.** (2003). Phylogenetic split of *Larix*: Evidence from paternally inherited cpDNA trnT-trnF region. *Plant Systematics and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00606-002-0264-3>
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B.** (2007). *Forest genetics*. CABI.
- Wolfe, K. H., Li, W. H., & Sharp, P. M.** (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Wu, C.-S., Lin, C.-P., Hsu, C.-Y., Wang, R.-J., & Chaw, S.-M.** (2011). Comparative Chloroplast Genomes of Pinaceae: Insights into the Mechanism of Diversified Genomic Organizations. *Genome Biology and Evolution*, 3, 309–319. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr026>
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J., & Woese, C. R.** (1985). Mitochondrial origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.13.4443>
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M.** (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*, 12(3), 563–584. Získáno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675814>
- Zimorski, V., Ku, C., Martin, W. F., & Gould, S. B.** (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.008>