

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA  
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ  
KATEDRA EKOLOGIE**

**Optimalizace mikrosatelitových markerů za účelem stanovení genetické  
variability u šťovíku alpského (*Rumex alpinus* L.)**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Jurasová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Petra Hlásná Čepková, Ph.D.

Bakalantka: Jana Kačenová

2018

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jana Kačenová

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Optimalizace mikrosatelitových markerů za účelem stanovení genetické variability u šťovíku alpského (*Rumex alpinus* L.)**

Název anglicky

**Optimization of microsatellite markers for assessment of genetic diversity in alpine dock (*Rumex alpinus* L.)**

---

### Cíle práce

Cílem práce je prostudovat a zpracovat současný přehled literatury, který se zabývá invazním druhem šťovíkem alpským a dále molekulární metodou mikrosatelitů (SSR). Dále se prakticky seznámit s metodou SSR a zároveň provést optimalizaci využití mikrosatelitových sekvencí stanovených dle Šurinové et al. (2018).

### Metodika

1) Praktická část:

- zpracování literární rešerše

2) Experimentální část

- izolace DNA z listů šťovíku alpského

- optimalizace podmínek PCR reakce pro šťovík alpský

- diskuze, porovnání výsledků s výsledky jiných studií, závěry

**Doporučený rozsah práce**

30

**Klíčová slova**

Rumex alpinus, SSR, genetická variabilita

---

**Doporučené zdroje informací**

Klimeš L., Klimešová J., 1996: Effects of rhizome age and nutrient availability on carbohydrate reserves in Rumex alpinus rhizomes. *Biologia* 51, 457–461.

Šťastná P., Klimeš L., Klimešová J., 2010: Biological flora of Central Europe: Rumex alpinus L., Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 67–79.

Šurinová M., Jarošová A., Münzbergová, Z., 2017: Microsatellite markers for study of the invasive species Rumex alpinus (Polygonaceae) (in the review procedure)

---

**Předběžný termín obhajoby**

2017/18 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

Mgr. Vladimíra Jurasová, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ekologie

**Konzultant**

Ing. Petra Hlásná Čepková Ph.D.

---

Elektronicky schváleno dne 27. 3. 2018

**doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.**

Vedoucí katedry

---

Elektronicky schváleno dne 27. 3. 2018

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Děkan

V Praze dne 17. 04. 2018

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Vladimíry Jurasové, Ph.D., že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze .....

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Vladěce Jurasové, Ph.D. za všechen čas a cenné připomínky, které měla k mé práci. Taky bych chtěla poděkovat za obrovskou trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Petře Hlásné Čepkové Ph.D. za čas, který věnovala připomínkám a opravám v textu. Poděkovat bych chtěla i Ing. et Ing. Michaele Jungové, která se mnou trávila čas v laboratoři molekulární genetiky.

Zvláštní poděkování patří mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia. Děkuji také svému příteli a nejmenované kamarádce za obrovskou podporu a jejich čas, který věnovali hlubšímu vysvětlení dané problematiky.

## Abstrakt

Šťovík alpský (*Rumex alpinus*) je vytrvalá, nitrofilní rostlina, která je z čeledě rdesnovité (*Polygonaceae*). Na území Čech byl pravděpodobně zavlečen a je nejspíše nepůvodní, ale dá se považovat za již zdomácnělou rostlinou horských a podhorských luk. V této bakalářské práci byla provedena optimalizace mikrosatelitových markerů na vzorcích z pěti různých šťovíkových populací pomocí osmi ověřených mikrosatelitových sekvencí DNA. Porovnávány byly populace získané z Krkonoš a Švýcarských Alp (kanton Graubünden).

Výsledky PCR analýz byly porovnány s dosavadní literaturou. Získané PCR produkty odpovídaly výsledkům předcházející studie, co se týče rozsahu jejich velikosti. Pozorovaná variabilita v délce těchto fragmentů na agarózovém gelu mezi testovanými populacemi může indikovat potenciální genetickou variabilitu způsobenou velkou vzdáleností a geografickou bariérou. Tato variabilita bude studována v následných studiích.

Klíčová slova: šťovík alpský (*Rumex alpinus*), SSR, genetická variabilita

## Abstract

Alpine dock (*Rumex alpinus*) is a perennial, nitrophilic plant of the family *Polygonaceae*. It is probably a non-native species in the Bohemia region of the Czech Republic, which was probably introduced by human activity in the past. Nevertheless, it has already domesticated in the area of mountain and sub-mountain meadows. In this study, we have performed optimization of the microsatellite markers on samples from five different populations using eight verified microsatellite DNA sequences. Alpine dock populations from Krkonoše Mountains (Czech Republic) and Alps (Switzerland, canton Graubünden ) were used in the study.

The results of the PCR analysis were compared with the up-to-date literature. Obtained PCR products were in size in accordance with the published antecedent study. Observed variation in the size of those fragments, as visible on the agarose gel electrophoresis, between the populations can indicate potential genetic variability caused by the geographical barrier and distance. This potential variability is planned to be studied in the consequent studies.

Keywords: alpine dock (*Rumex alpinus*), SSR, genetic variability

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce .....	9
3. Literární přehled .....	10
3.1. Taxonomie šťovíku alpského .....	10
3.2. Morfologie šťovíku alpského .....	10
3.3. Rozšíření šťovíku alpského .....	11
3.4. Rozmnožování šťovíku alpského .....	13
3.5. Nároky na živiny .....	13
3.6. Příbuzné druhy .....	14
3.7. Problematika invaze šťovíku alpského.....	14
3.8. Využití šťovíku alpského .....	15
3.9. Genetická diverzita.....	16
3.10. Průtoková cytometrie.....	16
3.11. Genetické markery.....	16
3.12. Molekulární markery .....	17
3.13. Mikrosatelity.....	18
3.14. PCR.....	20
4. Metodika .....	22
4.1. Sběr vzorků.....	22
4.2. Průtoková cytometrie .....	22
4.3. Extrakce DNA .....	23
4.4. Mikrosatelity .....	25
4.5. PCR .....	26
5. Výsledky .....	28
5.1. Průtoková cytometrie .....	28
5.2. Extrakce DNA .....	28
5.3. PCR .....	31
6. Diskuze .....	33
7. Závěr .....	34
8. Literatura.....	35

# 1. Úvod

Do České republiky byl šťovík alpský (*Rumex alpinus*) pravděpodobně zavlečen asi na přelomu 16. a 17. století alpskými dřevaři, kteří tuto rostlinu používali jako užitkovou. S postupným ubýváním hospodářské činnosti v horských oblastech na našem území docházelo k šíření šťovíku alpského. Šťovík alpský je vytrvalá, nitrofilní rostlina, která je z čeledě rdesnovité (*Polygonaceae*). Dříve byl hojně pěstován jako užitková rostlina jak pro lidi, tak pro dobytek (Šťastná 2009). Přirozeně se nachází v horských oblastech, jako jsou Alpy, Pyreneje a Karpaty, od nadmořské výšky 800 m nad mořem (Wagenitz 1981). V našich podmínkách je šťovík alpský považovaný za plevelnou a invazní rostlinu, která vytlačuje přirozené rostliny horských luk, kde se rozmnožuje jak vegetativně, tak i generativně, na co poukázala ve své práci Bucharová (2003) a Říčařová (2011).

Tato bakalářská práce na optimalizaci mikrosatelitových markerů u šťovíku alpského předchází studiu genetické variability šťovíku alpského v České republice i v Evropě.



## 2. Cíle práce

- Shrnutí dosavadních poznatků o výskytu, šíření, morfologické a genetické variabilitě šťovíku alpského ze současného přehledu literatury.
- Shrnutí a zpracování molekulární metody mikrosatelitů (SSR).
- Praktické seznámení s metodou SSR.
- Provedení optimalizace využití mikrosatelitových sekvencí stanovených podle Šurinové a kol. (2017).

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Taxonomie šťovíku alpského

Šťovík alpský (*Rumex alpinus*) patří do rodu šťovík (*Rumex*), do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*), do řádu hvozdíkotvaré (*Caryophyllales*), do třídy vyšších dvouděložných (*Rosopsida*), do oddělení krytosemenných (*Magnoliophyta*), do podříše cévnatých rostlin (*Tracheobionta*) a do říše rostlin (*Plantae*) (Kubát 2002).

#### 3.2. Morfologie šťovíku alpského

Je to vytrvalá rostlina, která je tvořena z horizontálních oddenků a nadzemních vegetativních výhonků s třemi až pěti velkými listy a plodnými stonky, které nesou menší lístky (Obr. 1) (Šťastná 2009). Podle Šmarda a kol. (1963) je rostlina až dva metry vysoká, ale Slavík a kol. (1995) tvrdí, že rostlina nedorůstá více jak 160 cm. Šťovík je diploidní, počet chromosomů se pohybuje v rozmezí od 18 až 20, záleží na regionální variabilitě (Šťastná 2009).



Obr. 1: Šťovík alpský (*Rumex alpinus*) (Jungová 2017)

Šťovík má mohutný mírně zploštělý vytrvalý a vícehlavý oddenek s průměrem okolo tří centimetrů. Oddenek nese svazky žlutavých kořenů a dělí se na segmenty. Tloušťka oddenku závisí na nadzemní biomase a každý segment odpovídá jedné vegetační sezóně. Nachází se pět centimetrů pod povrchem (Slavík a kol. 1995). Dojde-li k rozvětvení oddenku, přirůstají všechny větve stejně rychle (Klimeš 1992). Životnost jednotlivého segmentu je 20 let (Klimeš 1992), ale Šmarda a kol. (1963) uvádí, že oddenek má životnost osm let a pak začne odumírat.

Z koncových a postranních větví oddenku vyrůstá lodyha, která nese reprodukční orgány, a po vykvetení odumírá (Šmarda a kol. 1963). Lodyhy jsou silné a podélně rýhované (Slavík a kol. 1995).

Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté. Řapík dosahuje délky v rozmezí 70-80 cm. Samotné listy jsou až 50 cm dlouhé a téměř stejně široké, okrouhlé a na konci tupé, na okrajích jsou mírně zvlněné nebo ploché. Na bázi jsou srdčité (Šťastná 2009).

Květenstvím u šťovíku je bezlistá lata, s přímými větvemi. Květy jsou oboupohlavné a jsou opylovány větrem. Rostliny začínají kvést v červnu, plodit začínají v červenci (Obr. 2). Plodem jsou nažky, které jsou ukryté v trojbokých nebo srdčitých krovkách (Šmarda a kol. 1963).

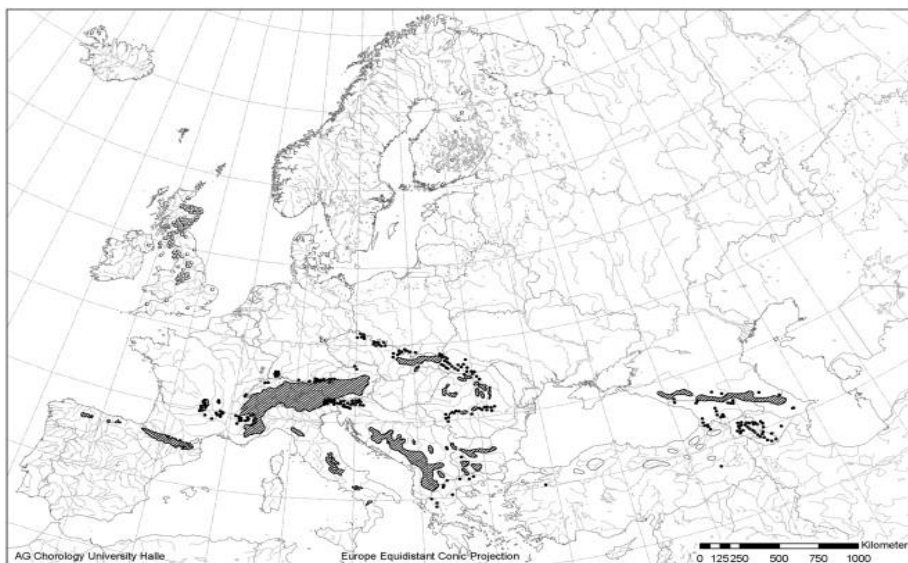


Obr. 2: Porost šťovíku alpského v Krkonoších (Jungová 2017)

### 3.3. Rozšíření šťovíku alpského

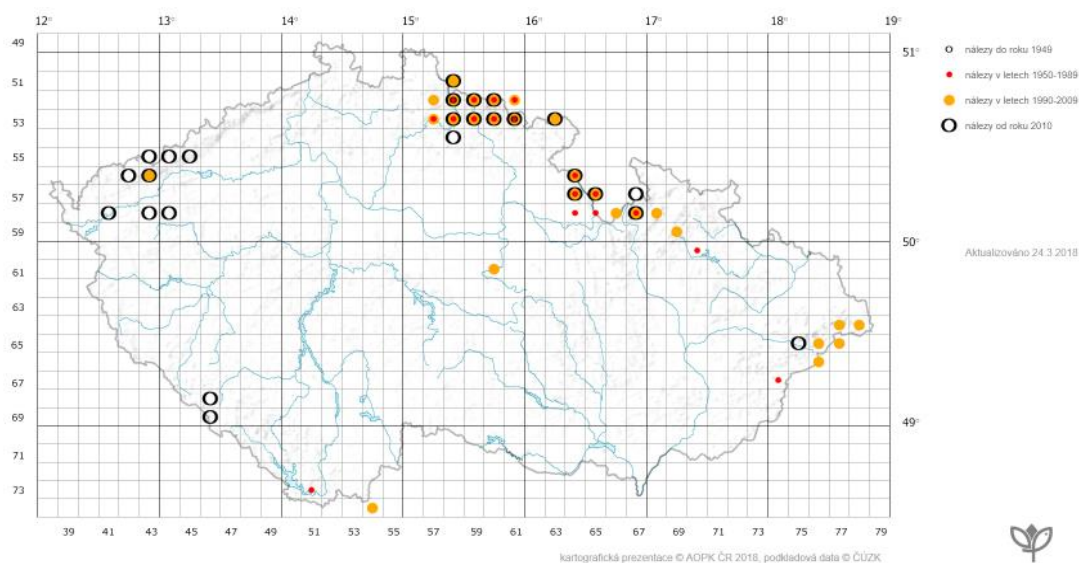
Šťovík alpský (*Rumex alpinus*) je nejrozšířenější v horských oblastech až po alpské zóny, od nadmořské výšky 800 m n. m. asi do 2600 m n. m. (Šťastná 2009). Původně se nachází v Pyrenejích, Alpách, Karpatech, na Balkánském poloostrově, na Kavkaze (Obr. 3) (Wagenitz 1981). Vyskytuje se také ve Velké Británii a Skandinávii, a ve

východní části Severní Ameriky na pomezí USA a Kanady, kam byl pravděpodobně zavlečen (Šťastná 2009).



Obr. 3: Rozšíření šťovíku alpského v Evropě (Šťastná 2009)

Nejčastěji se nachází v antropogenních lokalitách, jako jsou silniční příkopy, skládky, opuštěné horské louky a další místa, kde je půda bohatá na dusík (Klimeš 1992, Jarolímek a Kliment 2004), ale jeho původním stanovištěm jsou nivy horských potoků nad hranicí lesa (Schustler 1918). Do České republiky byl pravděpodobně zavlečen jako užitková rostlina na přelomu 16. a 17. století alpskými dřevaři, kteří ho měli jako krmivo pro dobytek, ale s postupným ubýváním hospodářské činnosti docházelo k většímu šíření šťovíku alpského (Obr. 4) (Wagenitz 1981).



Obr. 4: Rozšíření šťovíku alpského v ČR (AOPK ČR, ©2018)

### 3.4. Rozmnožování šťovíku alpského

Šťovík se rozmnožuje pohlavně (generativně) pomocí semen s vysokou klíčivostí až 95 %, která přetrvává až 13 let podle Holuba (1986) nebo se rozmnožuje nepohlavně (vegetativně), pomocí klonálního růstu a pomocí úlomků oddenků (Šmarda a kol. 1963). Semena šťovíku alpského mají významnější úlohu při šíření rostliny na větší vzdálenosti, než šíření pomocí oddenků. Díky krovkám i dobře plavou, což umožňuje šíření rostliny po proudu vodních toků (Holub 1986). Řičařová (2011) zjistila, že semena, která se šíří pomocí vodních toků, se nacházela až 100 metrů od jejich zdroje, naopak semena, která se šíří pomocí větru, se nacházela 13 až 20 metrů od matečné populace. Množství semen a jejich schopnost se šířit na velké vzdálenosti mohou ovlivňovat meteorologické vlivy, jako jsou bouřky a přívalové deště (Řičařová 2011). I pod porosty bývá semenná banka velmi bohatá. Bucharová (2003) uvádí až 3200 semen/m<sup>2</sup>, Handlová (2006) uvádí rozmezí 6000-18000 semen/m<sup>2</sup>. Klíčivost semen se pohybuje kolem 95% a pravděpodobně semena v půdní bance jsou uchovávána po dlouhou dobu (Holub 1986). Semenáčkům se nedaří uchytit v uzavřeném porostu, kde je větší konkurence rostlin. Ve větší míře klíčí na jaře a podzim, ale jakmile se uzavře listové patro, záhy odumírají. Špatně se také uchycují v zapojených drnech na loukách. Ke zdařilému vyklíčení potřebují místní disturbanci, která dodá semenáčkům dostatečný prostor (Červenková 2007).

### 3.5. Nároky na živiny

*Rumex alpinus* patří mezi nitrofilní druhy. Roste na velkých plochách, které jsou obohaceny o živiny, zejména o organický fosfor a dusík (Málková 2000). Díky velkému množství oddenků, které postupně odumírají, se znovu půda obohacuje o živiny (hlavně dusík). Díky tomu je šťovík schopný vytrvat na jednom místě bez dalšího přísunu živin zvenčí (Janata 2010).

### 3.6. Příbuzné druhy

Jedním z příbuzných druhů šťovíku alpského je šťovík tupolistý (*Rumex obtusifolius*), který patří v Evropě k nejrozšířenějším a nejobtížnějším plevelům travních porostů (Martinková, Honěk 2001). Donedávna byl uváděn jako složka trvalých travních porostů. Velký nárůst tohoto druhu byl zaznamenán v poválečném období, kdy se rozšířil na všechny půdy od nížin až po horské oblasti. Předpokládá se, že hlavní příčinou šíření bylo vysévání nečistého osiva jetelovin. Šťovík tupolistý je vytrvalý plevel, který pochází z Evropy a jihovýchodní Asie. V současné době jej můžeme nalézt ve více než 70 zemích světa. Vyskytuje se na rumišťích, na přehnojených místech a na březích vod (Ondrák 2014). Svými ekologickými nároky se velmi málo liší od šťovíku kadeřavého (*Rumex crispus*) a podle Klimeše (1993) se v porostech vyskytují také neplodní kříženci obou druhů, kteří jsou označováni jako *Rumex pratensis*. Za jednu z pěti nejrozšířenějších rostlin světa je považován šťovík kadeřavý. Můžeme ho najít od nížin až k pahorkatinám. Původně se nalézal v depresích vodních toků, dnes ho můžeme najít podél cest, neudržovaných místech, pastvinách a loukách. Patří mezi časté plevelné druhy a jeho přítomnost v pícninách snižuje jejich krmnou hodnotu. Šťovík kadeřavý se často a úspěšně kříží s jinými druhy rodu *Rumex*. V České republice bylo zjištěno osm hybridů šťovíku kadeřavého (Daníhelka a kol. 2012).

### 3.7. Problematika invaze šťovíku alpského

V Krkonoších se vyskytují rozsáhlé porosty šťovíku alpského, které postrádají hodnotu původních luk, ale také narušují estetiku okolní krajiny. Z tohoto důvodu se snaží správa Krkonošského národního parku (KRNAP) i soukromí hospodáři o likvidaci. Likvidace je značně obtížná. Po pokosení snadno regeneruje z oddenků a při použití postřiku herbicidem se porost obnovuje z velkého množství semen v půdě. (Bucharová 2003).

Kvůli problematice šíření šťovíku podél cest navrhl Vítek (2005) řešení, které zahrnuje rekonstrukci cest a odstranění bazického materiálu, který podporuje růst zmiňovaného

šťovíku. Poukázal i na zajištění veřejných záchodů pro turisty, aby se zamezil přísun živin.

Mezi nejúspěšnější postup likvidace se řadí plošná nebo i bodová aplikace herbicidů (Janata 2010). Nejúčinnějším a nejvíce používaným herbicidem je Roundup, což vyplývá ze získaných zkušeností. První postřik je prováděn na začátku jara a zasažená plocha se musí chodit kontrolovat, případně znovu ošetřit nedostatečně zasažená místa nebo jednotlivé rostliny a nově vzrostlé semenáčky. Tento proces je nutno opakovat více než pět let a jedná se o poměrně drahou metodu a také škodlivou pro přírodu i člověka (Bucharová 2003, Janata 2010).

Správa Krkonošského národního parku používá kombinaci chemického a mechanického způsobu likvidace. Mezi červnem a srpnem se na listy rostlin nanáší 5% postřik herbicidu (Roundup). Dále se mezi srpnem a zářím pokryje místo pokosenou trávou z přilehlých luk. Výška mulče by neměla přesahovat 10 cm, tím se zabrání, aby část semen vyklíčila. Při opomenutí jednoho z těchto kroků je důležité odstranit květní lodyhy z porostu, aby nedošlo k dalšímu vysemenění semen (Bucharová 2003, Janata 2010).

### 3.8. Využití šťovíku alpského

Šťovík alpský je v mnoha oblastech považován za nechtěný plevel a invazní rostlinu, ale také je v některých místech historicky známý jako cenná rostlina. Šťovík může být jednou z nejstarších známých zelenin. Lidé ji používali při vaření i jako léčivou bylinu. Listy se používali proti kašli, na citlivou pokožku a vysušené kořeny se zase používali na trávicí problémy. Nejdůležitější využití sušených listů šťovíku bylo jako krmivo pro dobytek, převážně pro prasata a kozy. Využíval se jak k pastvě, tak i k sušení. K udržení zásob šťovíku se zakládali šťovíkové farmy, například ve Švýcarsku (Maude 2005).

### 3.9. Genetická diverzita

V současné době je velmi málo známo o genetickém stavu šťovíku alpského, protože i přes jeho invazivní činnost nebyla publikována žádná genetická studie, která by zkoumala populační strukturu, tok genů mezi populacemi a jejich příbuznost (Šurinová a kol. 2017). Ačkoliv je známo že druh je vysoce klonální (Klimeš 1992) a šíří se i semeny. Reycheva a kol (2013) vyvinuli 10 mikrosatelitních markerů pro mezidruhové srovnání s pěti druhy šťovíku včetně šťovíku alpského. Počet chromosomů u šťovíku alpského se liší v závislosti na regionální variabilitě. Vyskytují se rostliny jednak s 18 chromosomy, ale i s 20 chromosomy. Populace šťovíku s 18 chromosomy se vyskytovaly v Rakousku. U druhu šťovíku alpského jsou známi dva hybridy, kteří se nacházejí i na území České republiky. Prvním je *Rumex x mezei*, který je křížencem mezi š. alpským a š. tupolistým. Druhý je hybrid mezi š. alpským a š. dlouholistým a nazývá se *Rumex sourekii* (Šťastná 2009).

### 3.10. Průtoková cytometrie

Nejčastější způsob využití průtokové cytometrie bývá ve studiích, kde se stanovuje ploidní stupeň analyzovaného materiálu. Tato metoda se používá k výzkumu v mnoha biologických oborech, například: stanovení obsahu jaderné DNA, analýza buněčného cyklu a další. Základní součástí každého cytometru je průtoková komůrka. Její úkol je seřadit analyzované částice. Následně jsou tyto částice jednotlivě vedeny k laserovému paprsku. Optický systém je tvořen ze dvou částí: excitační, která zahrnuje laser, soustavu čoček, hranoly na usměrnění světelného paprsku a sběrné části, kterou tvoří zrcadla a filtry. Elektronický systém převádí částice na elektronický signál, který je poté zpracován počítačem (Suda 2005).

### 3.11. Genetické markery

Ke stanovení genetické diverzity jsou používány metody, které jsou založeny na znalostech daného organismu. Mezi tyto metody patří takzvané genetické markery, které nám na základě rozdílů mezi jedinci ukazují jejich vzájemnou odlišnost.



Genetické markery jsou založeny na fenotypových rozdílech, jsou podmíněny geneticky. Genetické markery se obecně používají např. při zjišťování rozdílů mezi divokými a domestikovanými populacemi, genového toku, populační struktury, míry hybridizace nebo při studiu fylogeneze a fylogeografie. Jsou také nezbytnou složkou ve šlechtitelství a při vytváření nových variet okrasných i užitkových rostlin (Williams a kol. 1990, USDA 2006). Tyto markery jsme schopni rozdělit do třech základních kategorií podle možnosti jejich využití, tj. molekulární, morfologické a biochemické (Semang 2006). Typ genetického markeru, který by měl být použit při tomto výzkumu, závisí na charakteristice druhu a na charakteristice primeru. Markery mohou odhalit různou variabilitu, zda jsou dominantní nebo kodominantní. Charakteristika markeru může být poměrně rychle měněna a vše závisí na technologii jeho vývoje a na úrovni laboratorních technik (USDA 2006).

### 3.12. Molekulární markery

Molekulární markery jsou sekvence DNA, které lze snadno rozpoznat a jejichž dědičnost lze sledovat. Můžeme je lehce použít díky přirozeně se vyskytujícímu DNA polymorfismu. Pro přesné stanovení variability musí být marker polymorfní. To znamená, že chromozom nesoucí mutantní geny lze snadno odlišit od chromozomů s normálním genem. Důležitá je také kodominantní dědičnost, která se používá k odlišení homozygotních a heterozygotních genů. Ideální marker by měl být hojně zastoupen v celém genomu a měl by být snadno a levně detekován a reprodukován (Weising a kol. 1995).

Je velmi obtížné najít ideální marker, který bude obsahovat všechny tyto vlastnosti, ale podle jejich vlastností a využití je můžeme rozdělit do dvou skupin: (1) markery nezaložené na PCR, jako jsou markery založené na hybridizaci a (2) markery založené na metodě PCR (Kumar a kol. 2009, Rentaríá 2007).

Markery založené na PCR jsou založeny na in vitro amplifikaci sekvencí DNA a tyto amplifikované fragmenty jsou poté separovány elektroforeticky podle rozdílných velikostí částic DNA. Známými PCR markery jsou: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

nebo SSR markery (mikrosatelity neboli „Simple Sequence Repeat“) (Kumar a kol. 2009).

### 3.13. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou běžné genetické markery, které jsou využívány ke zkoumání mezidruhové a vnitrodruhové genetické variability. Znalost toho, jak je genetická variabilita utvořena, pak může posloužit ke zjištění evolučních procesů a propojenosti populací, čehož je následně využito v plánování ochranných strategií pro zachování biodiverzity (Balloux, Lugon-Moulin 2002). Mikrosatelity, také nazývané mikrosatelitní DNA nebo SSR (simple sequence repeats), jsou krátké, tandemově se opakující úseky oligonukleotidů, ve kterých se mnohokrát opakují určité motivy sekvencí (např.  $(A)_n$ ,  $(AT)_n$ ,  $(ATA)_n$ , kde index  $n$  označuje počet opakování - repeticí (Metody analýzy mikrosatelitů 2017). Mikrosatelity obsahují několik párů bází (1-6), ale někteří vědci jsou toho názoru, že tandemové řady obsahují 7-9 párů bází (Bhargava, Fuentes 2010). Počet opakování v konkrétním místě DNA (na lokusu) definuje alelu, jejíž délka lze zjistit pomocí PCR amplifikace konkrétního místa DNA za pomoci primerů, které přiléhají k mikrosatelitní sekvenci. Z toho plyne, že pro mikrosatelitní analýzu potřebujeme znát okolní sekvenci. Mikrosatelity vznikají beztemplátovou syntézou DNA při zvýšené teplotě a za přítomnosti různých koncentrací iontů. Bývají specifické dynamickými mutacemi, což znamená, že se přidávají či ubírají celé kopie základního motivu. Například u člověka může nadměrné prodloužení mikrosatelitů vést i k neurodegenerativním onemocněním. Mikrosatelity jsou velmi nestabilní, snadno a reverzibilně mění své uspořádání, čímž mění své vlastnosti. V důsledku toho se pak při replikaci jeví polymeráze jiné, než jsou, což způsobí, že polymeráza změní délku syntetizovaného řetězce. Jejich význam však není dosud objasněn (Kypr 1999, Vieira a kol. 2016, Metody analýzy mikrosatelitů 2017). Mikrosatelity se považují za jedny z nejvhodnějších genetických markerů, které se využívají v rostlinné genetice ke zjišťování příbuznosti, kvůli jejich hojnému výskytu v celém genomu. Jsou extrémně variabilní a umožňují rozlišit heterozygoty. V jaderné DNA má každý jedinec dvě kopie mikrosatelitů (tzn. diploidní jedinec = 2 alely), tj. jeden zděděný po matce a druhý po otci (Metody analýzy mikrosatelitů 2017). Nevýhoda mikrosatelitů spočívá v obtížnosti jejich nalezení. Každá repetitivní

sekvence (mikrosatelit) má na svém konci i začátku „flanking regions“, což jsou přiléhající oblasti, které jsou stejné jak pro daný mikrosatelit, tak i pro všechny jedince zkoumaného druhu. Toho se využívá při navrhování primerů (řetězec o několika bázích, díky kterému může DNA polymeráza začít replikovat DNA). Sekvence primerů se zjišťuje sekvenováním (jde o zjišťování pořadí nukleotidů) genomu nebo se často využívá znalosti primerů příbuzných druhů (cross-amplifikace) (Fornůstková 2007).

Pro šňovík alpský je známo 15 mikrosatelitových sekvencí (Šurinová a kol. 2017), které jsou sepsány v tab. 1.

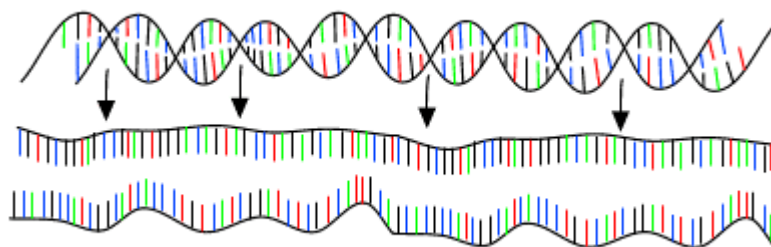
Tab. 1: Přehled dostupných primerů (Šurinová a kol. 2017)

Identifikace	Lokus	Primerová sekvence (5'-3')	Opakující se	Přístupový kód GenBanky
1	Ram32	F: AGTAATATTCTTAGACCATCACCACA R: TGTCGACATGAAGCTGTGAA	(ACCAC) <sub>6</sub>	MF460423
2	Ram49	F: GCAGAAGCGGAGGAAGATAC R: CCGCATCGCTACGAGACT	(GAG) <sub>7</sub>	MF460424
3	Ram92	F: TGTGGAGTAAATTGGGGAATG R: GCCCAGCAGTAGCAGTGTC	(AG) <sub>14</sub>	MF460425
4	Ram94	F: GGGAGAGGGTGGGAGATTC R: CACAGGCTCACACGTTGTCT	(GA) <sub>17</sub>	MF460426
5	Ram103	F: GTAAACCGCGGCGTAATGTA R: GAGATTCATAGGTGGCGAGG	(GA) <sub>11</sub>	MF460427
6	Ram116	F: CAAACAAAAGCCAAACCCAT R: TCTTCATTCTCCCTCGATCTC	(GA) <sub>7</sub>	MF460428
7	Ram130	F: ATTGAAACCCAGGACCATCA R: TGAAGTGCAACCATAAAGCG	(AG) <sub>9</sub>	MF460429
8	Ram146	F: ACCTTAAACCCTGCCCAAAT R: TCACAACGGTCCAAGTCAA	(CAA) <sub>5</sub>	MF460430
9	Ram165	F: TGCTACACGAGCTGATGCTT R: TTTCTCTGCTCGGATTGGAT	(TTC) <sub>6</sub>	MF460431
10	Ram168	F: TCGGATTCTTCGAGAGGAGA R: ATTTCCGATTCCCAATTTCC	(AG) <sub>6</sub>	MF460432
11	Ram173	F: AAGGAGCGTGTGGCAGATAA R: TCAAGTGGGTTTTGTAGCTGTG	(AG) <sub>5</sub>	MF460433
12	Ram193	F: GAGTTCCCACCACAAGAAGC R: CTAGTCCTGGCCTCTACTGC	(TC) <sub>10</sub>	MF460434
13	Ram198	F: AATGGGATGGATTGGAAGGC R: ACTCTCACAGTCACAGGCTC	(GA) <sub>17</sub>	MF460435
14	Ram199	F: CCCACGAGTTACCCAATCAAC R: TTCTTGACCCTGAATTGTTTCG	(CA) <sub>17</sub>	MF460436
15	Ram200	F: AAAGTGGCCACATTGAGGT R: GTGTCACACTGAAGAACCTG	(AG) <sub>14</sub>	MF460437

### 3.14. PCR

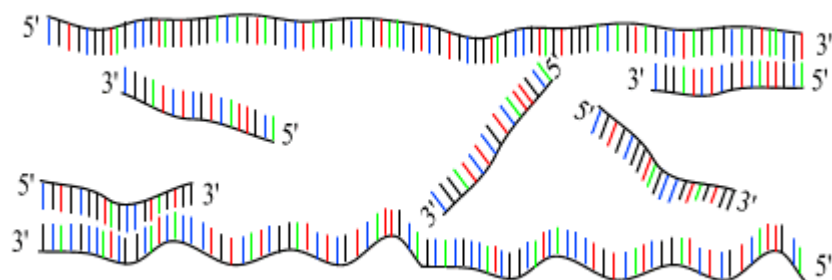
Polymerázová řetězová reakce (PCR), pocházející z anglického názvu „polymerase chain reaction“, byla vyvinuta v Cetus Corporation v Emerville v Kalifornii a v roce 1985 byla Kary B. Mullisem uvedena do praxe. PCR je metoda rychlého zmnožení vybraného úseku DNA. Množený úsek DNA je ohraničený primery (fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech), od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA, kterou provádí termostabilní DNA polymeráza. K tomuto procesu se používá přístroj termocykler, který zajišťuje potřebné teplotní cykly (cca 30-40), které spočívají v opakování třech kroků (Kočárek 2007, Lysková 2008):

1. Denaturace (Obr. 5) – probíhá 1 minutu při teplotě 94-95°C. Reakce je založena na schopnosti dvoušroubovice DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat, když se teplota sníží za podmínky zachování pravidla komplementarity bází. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků a k rozvolnění dvoušroubovice DNA. Vznikají tak dvě jednovláknové molekuly DNA, na které v dalším kroku mohou přisedat primery. (Kočárek 2007, Lysková 2008).



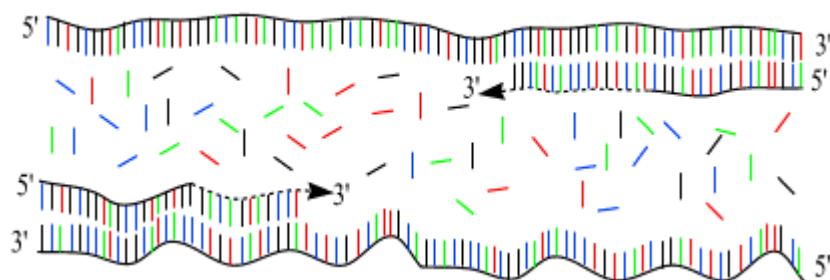
Obr. 5: Denaturace (Vierstraete 1999)

2. Hybridizace (Obr. 6) – někdy nazývaná anglickým slovem „annealing“. Fáze probíhá 45 sekund při snížené teplotě 30-65°C. Při této teplotě dochází k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Primery (chemicky syntetizované krátké jednovláknové oligonukleotidy) mají sekvenci komplementární k sekvencím na 3' konci obou vláken rozmnožovaného úseku. (Kočárek 2007, Lysková 2008).



Obr. 6: Hybridizace (Vierstraete 1999)

3. Extenze (Obr. 7) – probíhá 2 minuty. Teplota této fáze závisí na použité DNA polymeráze (nejběžnější DNA polymerázy mají teplotní optimum mezi 72-80°C). V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA, ve směru od 5' konce k 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA. Aby došlo k syntéze nových vláken, je třeba v PCR reakci nadbytečné množství deoxynukleotidtrifosfátů (Kočárek 2007).



Obr. 7: Extenze (Vierstraete 1999)

Výsledné produkty PCR se nazývají amplikony, to jsou úseky DNA, které mají definovanou délku, jejichž velikost se obvykle pohybuje v desítkách či tisících párů bází. Přítomnost amplikonů ve směsi se prokazuje stanovení jejich velikosti pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktů PCR (Lysková 2008).

## 4. Metodika

### 4.1. Sběr vzorků

Vzorky listů šřovíku alpského pro tuto práci byli odebrány ze dvou lokalit v Krkonoších, a ze tří lokalit ze Švýcarských Alp. Z jedné lokality byly odebrány listy z 20 rostlin, které byly sesbírány každých 10-15 m. Vzorky byly vloženy do papírových sáčků a usušeny. Pro analýzu bylo použito 5 náhodně vybraných rostlin z 5 různých populací, celkem 25 rostlin (tab. 2).

Tab. 2: Výskyt rostlin použitých pro analýzy

Číslo vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Souřadnice
M5	Švýcarsko	Alpy	St. Moritz	N 46°29.17', E 9°49.99'
M10				
M11				
M13				
M20				
S1	Švýcarsko	Alpy	Schuders	N 46°59.56', E 9°44.33'
S13				
S14				
S18				
S20				
D1	Švýcarsko	Alpy	Davos	N 46°47.77', E 9°49.42'
D6				
D9				
D10				
D20				
U4	Česká republika	Krkonoše	Úpa	N 50°41.26', E 15°45.24'
U5				
U10				
U13				
U18				
H9	Česká republika	Krkonoše	Horní Mísečky	N 50°41.48', E 15°31.36'
H10				
H11				
H17				
H20				

### 4.2. Průtoková cytometrie

Pro stanovení ploidie bylo 25 jedinců analyzováno pomocí metody průtokové cytometrie (FCM). Jádra byla uvolněna z buněk nadrcením živých listů (přibližně 0,5-1 cm<sup>2</sup> listu) společně se stejným množstvím standardu. Listy byly homogenizovány v Petriho misce, ve které bylo přibližně 0,5 ml pufru Otto (0,1 M kyselina citrónová,

0,5% Tween-20, Otto, 1992, Doležel a kol. 2007). Potom byla jaderná suspenze filtrována použitím jemného nylonového pletiva do kyvety a následně byla na přístroji změřena ploidie.

### 4.3. Extrakce DNA

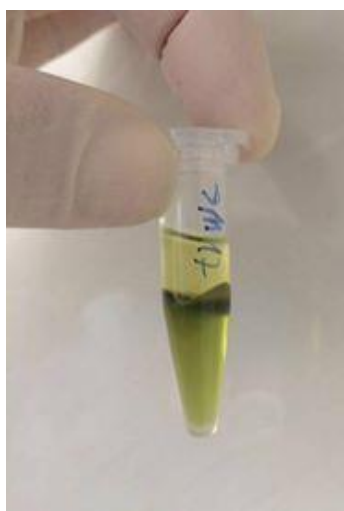
Extrakce DNA byla prováděna podle protokolu Doyle, J. J., Doyle J. L. (1987). V mikrozkuhavce bylo zhomogenizováno 0,1 g suchého materiálu šťovíku alpského pomocí přístroje Retsch Mixer Mill 200 (Retsch, Německo) po dobu 3 minut při frekvenci 30 otáček/s.

K izolaci rostlinného materiálu byla použita metoda CTAB (Doyle a Doyle, 1987). 700  $\mu$ l CTAB roztoku a 2% merkptoethanolu bylo přidáno do každého vzorku společně s 5  $\mu$ l RNasy A (10mg/ml) (Thermo Scientific, USA) a špetka PVP (Carl Roth, Německo). Poté se mikrozkuhavky promíchaly na vortexu a inkubovaly se 30 minut na termomixéru při 60°C a při 14000 otáček/min (Obr. 8). Vzorky se dále centrifugovaly 6 minut při 13200 otáček/min. V digestoři se supernatant přepipetoval do nových mikrozkuhovek (na každý vzorek se použila nová špička) a následně se přidalo 500  $\mu$ l směsi chloroform:isoamylalkohol (v poměru 24:1). Mikrozkuhavky se důkladně uzavřely a následně se 2 - 3x obrátily, aby se obsah promíchal a nechaly se stát cca 5 minut. Poté se znovu centrifugovaly po dobu 6 minut a při 13200 otáček/min. Po vyjmutí vzorků z centrifugy v mikrozkuhavkách vznikl dvoufázový roztok (Obr. 9), ze kterého se opatrně přepipetoval do nových mikrozkuhovek (o objemu 1,5 ml) čirý supernatant (450–500  $\mu$ l). K odpipetovanému supernatantu bylo přidáno 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu. Mikrozkuhavky se uzavřely a 1 - 2x se promíchaly a následně se nechaly stát přibližně 30 minut v -20°C. Po uplynulé době se vzorky centrifugovaly 3 minuty při 13200 otáček/min. Tentokrát se supernatant slil do kádinky a na dně mikrozkuhavky byl vidět drobný matně bílý pelet DNA. Otevřené mikrozkuhavky se převrátily dnem nahoru na filtrační papír. Poté se přidalo 400  $\mu$ l vychlazeného 96% ethanolu a následně se vzorky v mikrozkuhavce inkubovaly 3 minuty na termobloku při teplotě 37 °C a otáčkách 1200 za minutu a centrifugovaly 5 minut při 13200 otáček/min. Znovu se supernatant slil opatrně do kádinky a přidalo se 200  $\mu$ l vychlazeného 70% ethanolu a nechalo se cca 5 minut stát. Poté se znovu vzorky

centrifugovaly 3 minuty při otáčkách 13200 za minutu. Supernatant se slil do kádinky a mikrozukumavky se nechaly na filtračním papíře dnem vzhůru, aby stekl zbytek ethanolu. Pelet v otevřených mikrozukumavkách se nechal vysušit na termobloku o teplotě 65°C cca 6 až 10 minut. Sušení se ukončilo v tu chvíli, kdy lze pelet poklepem na uzavřenou mikrozukumavku oddělit od stěny. Vysušený pelet se rozpustil v 50  $\mu$ l dvakrát destilované vody (ddH<sub>2</sub>O) a uzavřené mikrozukumavky se inkubovaly deset minut na termobloku při teplotě 60°C a při 600 otáček/min. Potom se krátce promíchaly na vortexu a krátce se zcentrifugovaly. Kvalita a množství extrahované DNA se zjistila na 1% agarózovém gelu (obr.10). Pro další krok (PCR) jsou vhodné vzorky o koncentraci 20  $\mu$ l, a tak koncentrace byla kontrolována na přístroji Nano Drop 2000c device (Nano Drop products, USA) a protože většina vzorků měla koncentraci mnohonásobně vyšší, musely být vzorky naředěny ddH<sub>2</sub>O na potřebnou koncentraci. Vzorky byly uloženy v -20°C.



Obr. 8: Inkubace vzorků



Obr. 9: Dvoufázový roztok  
(Jungová 2017)





Obr. 10: Příprava vzorků na 1% agarózový gel (Jungová 2017)

#### 4.4. Mikrosatelity

Podle Šurinové a kol. (2017) je známo 15 mikrosatelitových sekvencí pro šťovík alpský. Pro optimalizaci mikrosatelitových markerů bylo vybráno 8 mikrosatelitových sekvencí pro následnou analýzu 25 vzorků šťovíku alpského z 5 různých lokalit. V této části byly použity mikrosatelitové sekvence, které byly sestaveny do dvou multiplexů (1 PCR multiplex: Ram32, Ram49, Ram116 a Ram146; 2 PCR multiplex: Ram92, Ram103, Ram130, Ram165), přičemž každý ze čtveřice primerů z jednoho multiplexů byl v reakci komplementován s jiným M13 univerzálním primerem značeným jedním ze čtyř fluorescenčních barviv (FAM, VIC, PET nebo NED) (tab. 3).

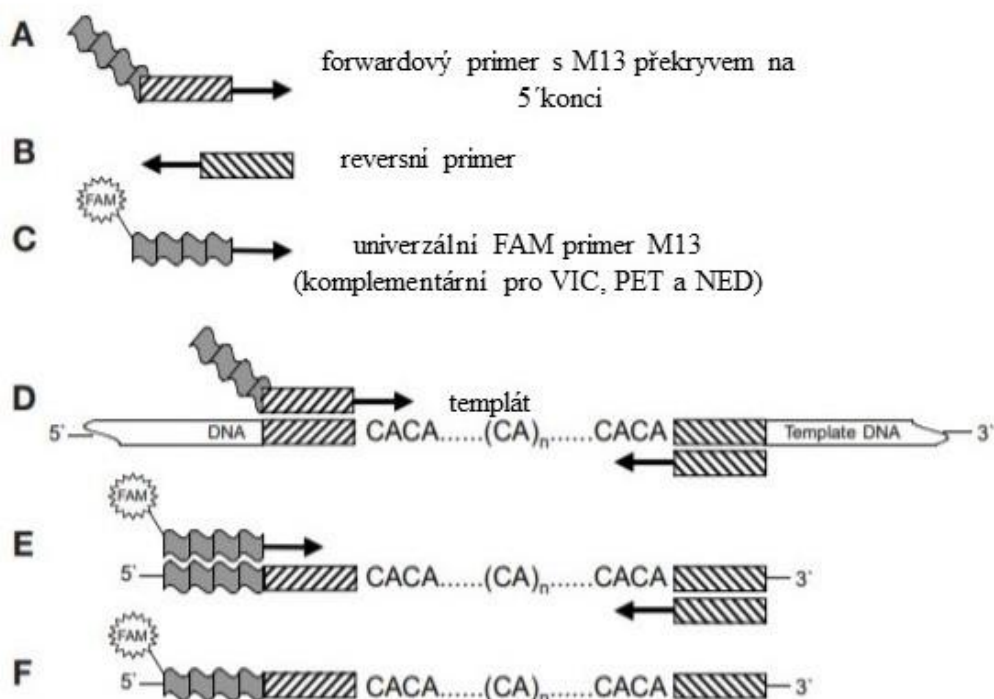
Tab. 3: Přehled použitých primerů

Lokus	Velikost fragmentu (bp)	Teplota nasedání primerů	Barva	PCR multiplex
Ram32	111–156	59°C	PET	1
Ram49	106–112	59°C	NED	1
Ram116	198–202	59°C	FAM	1
Ram146	302–317	59°C	VIC	1
Ram92	117–127	59°C	PET	2
Ram103	103–107	59°C	NED	2
Ram130	184–190	59°C	FAM	2
Ram165	149–152	59°C	VIC	2

Přehled primerových sekvencí (forward a reverse) v tabulce č. 1

#### 4.5. PCR

PCR byla provedena podle metodiky Schuelke (2000). Principem této metody je, že v prvním cyklu PCR forwardový primer s M13 překryvem je začleněn do PCR produktů. Tyto produkty jsou cílem pro M13 primer, který je začleněn v nadcházejícím cyklu PCR za snížené teploty nasedání primerů (tab. 4). Finální produkt může být analyzován na detekčním laserovém systému (např.: fragmentační analýza) (obr. 11).

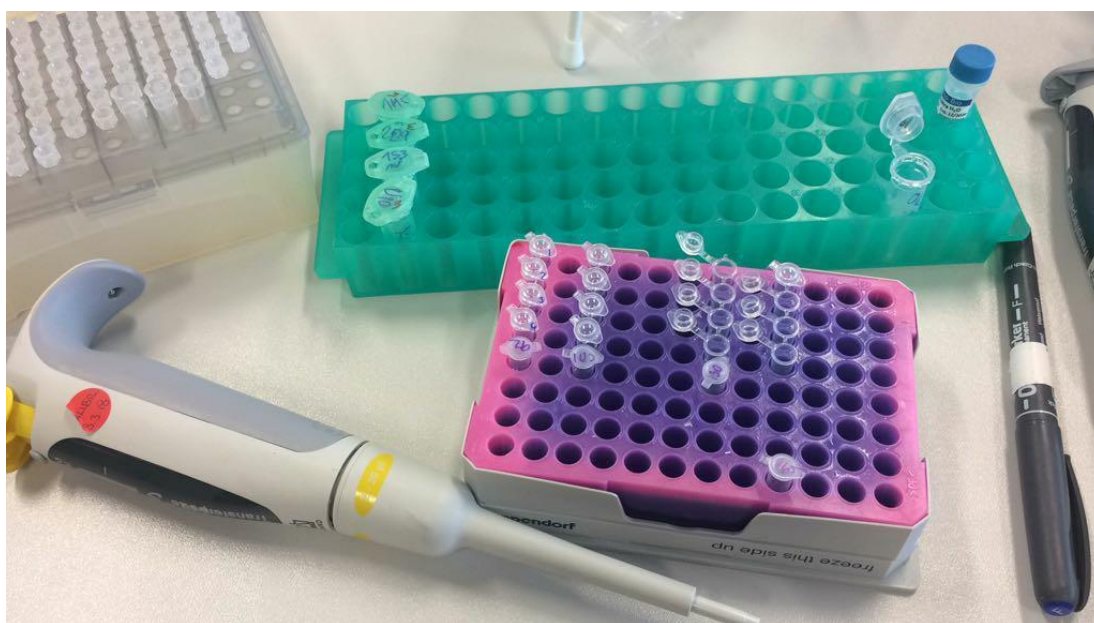


Obr. 11: Princip metody pro fluorescenční značení PCR produktů (Schuelke 2000)

Pro PCR reakci se vzorky připravily o celkovém objemu 5  $\mu$ l. Tento objem byl složený z 2,5  $\mu$ l QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Německo), primerů (reverse a forward o stejném objemu 0,125  $\mu$ l a koncentraci 10  $\mu$ M), 1,625  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, univerzální forward primer M13 značený fluorescenční barvou (0,125  $\mu$ l a koncentraci 10  $\mu$ M) (PET, VIC, NED a FAM), 0,5  $\mu$ l DNA (20 ng/ $\mu$ l) (Obr.12). Promíchané vzorky se vložily do termocykléru s následujícími kroky (tab. 4).

Tab. 4: Jednotlivé kroky PCR u vzorků *R. alpinus*

Krok	Teplota	Čas	Cyklus	Počet opakování
Denaturace	95°C	15 min		
Denaturace	95°C	20s	Cyklus I.	25
Nasedání primerů	59°C	30s		
Elongace	72°C	20s		
Denaturace	95°C	30s	Cyklus II.	10
Nasedání primerů	53°C	45s		
Elongace	72°C	45s		
Elongace	72°C	15 min		

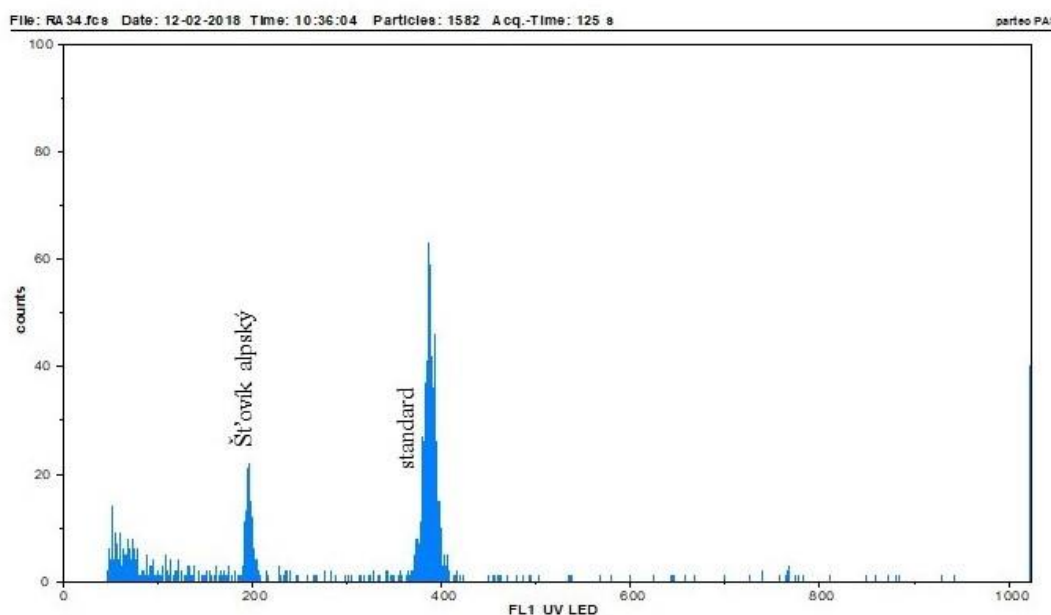


Obr. 12: Příprava vzorků na PCR (Jungová 2017)

## 5. Výsledky

### 5.1. Průtoková cytometrie

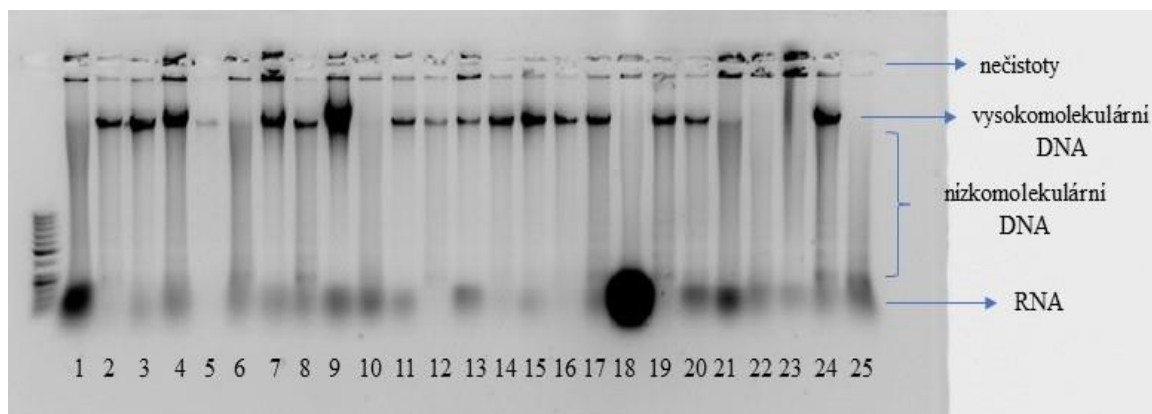
Fluorescenční stanovení ploidie a počtu jader izolovaných z čerstvé rostlinné tkáně šťovíku alpského. Vzorek šťovíku alpského se nachází na hodnotě 200, a proto se jedná o diploidní rostlinu (Obr. 13). Na hodnotě 400 se nachází standard. Bylo zjištěno, že všechny testované vzorky byly diploidní, přítomnost jiné ploidie nebyla zjištěna.



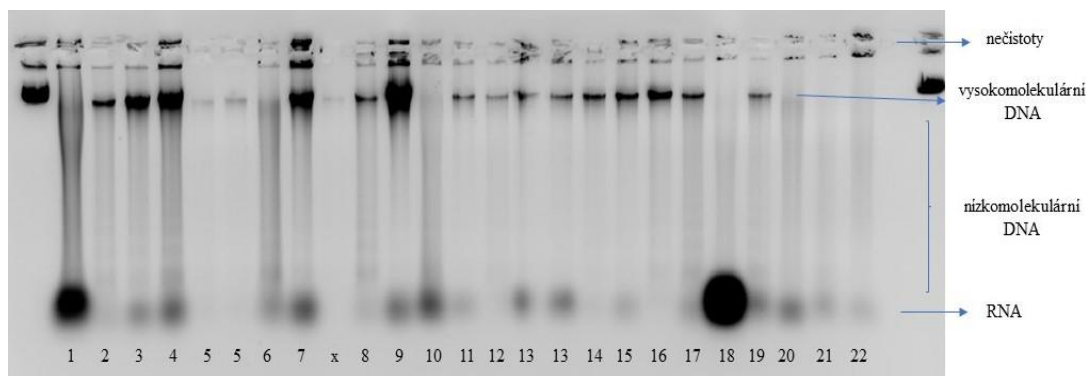
Obr. 13: Fluorescenční stanovení ploidie a počtu jader izolovaných z šťovíku alpského

### 5.2. Extrakce DNA

Izolace DNA byla prováděna podle protokolu Doyle a Doyle (1987). Kvalita DNA byla zjišťována na 1% agarózovém gelu (obr. 14 a obr. 15).



Obr. 14: Kvalita DNA na 1% agarózovém gelu po extrakci DNA. Byl použit žebřík GeneRuler 50 bp. Čísla vzorků na gelu odpovídají číslům vzorku v tab. 5.



Obr. 15: Kvalita DNA na 1% agarózovém gelu 2 měsíce po extrakci DNA. Na začátek a na konec gelu, místo žebříku, byla použita vyextrahovaná DNA bakteriofága lambdy. Vzorek číslo 5 a 13 je na gelu 2x, z důvodů kontroly. Písmeno X na gelu značí chybný vzorek.

Na obrázcích 14 a 15 lze vidět, že kvalita DNA je dobrá. 1% agarózové gely byly provedeny v rozmezí asi 2 měsíců. První gel byl proveden po extrakci DNA a další gel o dva měsíce později. Lze vidět proužky, které odpovídají kvalitní vysokomolekulární DNA. Kvalitní vyextrahovanou DNA je možno vidět například u vzorků 11 až 17. Je vidět i slabé potrhání DNA, což je možno vidět v oblasti nizkomolekulární DNA na obrázcích 14 i 15. K potrhání DNA dochází při extrakci DNA, tím že se naruší DNA drcením a čištěním vzorků. Na vzorku číslo 1 není vidět zřetelný proužek vysokomolekulární DNA a je tam jen vysoké množství zbytkové RNA a nizkomolekulární DNA, která je rozptýlená po celé délce vzorku. U vzorku číslo 1 by bylo na zvážení udělat novou izolaci DNA. Jak lze vidět na obr. 14 a obr. 15, použité vzorky obsahují zbytkovou RNA, i když při extrakci byla použita RNasa, která byla

použita v malém množství Zbytková RNA ve vzorku může ovlivňovat naměřenou koncentraci DNA. Koncentrace DNA byla kontrolována i změřením (tab. 5).

Tab 5: Měření koncentrace DNA na přístroji Nano Drop 2000c device

Číslo vzorku		Měření po extrakci DNA				Měření o 2 měsíce později		
Vzorek	Číslo na gelu	260/280	260/230	koncentrace	Rozdíl v %	260/280	260/230	koncentrace
M5	1	2,03	1,3	1506	-7,86	2,1	1,33	1388
M10	2	1,97	1,9	491	+9,26	1,96	1,76	541
M11	3	1,96	1,8	526	-29,75	2,03	1,78	370
M13	4	1,92	2,13	1082	-8,01	1,98	2,21	995
M20	5	1,8	1,78	64	+7,01	1,82	0,72	69
S1	6	1,9	1,95	956	-10,86	1,9	2,07	853
S13	7	1,92	2,1	1573	-2,39	1,9	1,98	1536
S14	8	1,94	2,06	639	-2,57	1,94	2,04	622
S18	9	1,87	2,01	2000	-45,68	1,94	2,16	1087
S20	10	2	2,03	1421	-6,89	1,96	1,96	1323
D1	11	1,95	1,93	537	-24,31	1,95	1,71	406
D6	12	1,94	1,77	432	+8,64	1,96	1,79	472
D9	13	2,01	1,72	506	-4,51	2,02	1,85	483
D10	14	1,86	2,2	461	-10,4	1,9	2,14	413
D20	15	1,75	1,86	425	+7,76	1,95	1,98	461
U4	16	1,85	1,29	390	+12,75	1,82	1,18	447
U5	17	1,93	1,93	488	-5,06	1,98	2,1	463
U10	18	1,56	1,34	2791	-3,42	1,95	1,97	2695
U13	19	1,94	2,06	639	-2,57	1,94	2,04	622
U18	20	1,98	1,3	463	-0,21	2,05	1,57	462
H9	21	1,98	1,78	1301	-34,41	1,97	2,09	853
H10	22	1,9	1,68	778	-20,19	1,94	2,21	621
H11	23	1,9	1,77	1709	-37,92	1,91	2,15	1061
H17	24	1,89	1,42	669	-38,4	1,89	2	412
H20	25	1,78	1,36	588	-19,94	1,92	2,21	471

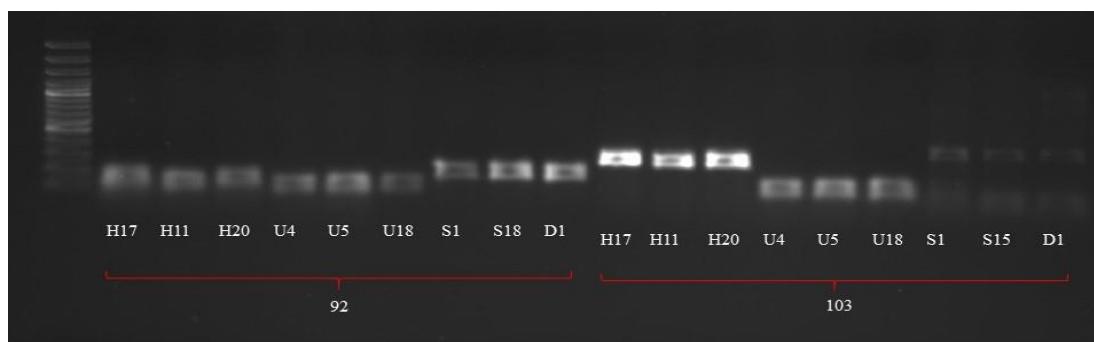
Měření na přístroji Nano Drop 2000c device (Nano Drop products, USA) ukázalo, že se jedná o stabilní DNA. U tohoto přístroje se počítá až s 20% směrodatnou odchylkou u měření vzorků. Pro hodnocení čistoty DNA se používá poměr absorpance při 260 nm a 280 nm. Čistá DNA se nachází mezi hodnotami 1,8-2. Kontaminovaná DNA má hodnoty menší než 1,8 a znečištění vzorku RNA je patrný, když hodnoty jsou větší než 2. Většina vzorků v tabulce 5 nabývá hodnot kolem 1,9, dle citace je tato DNA čistá a vhodná pro následnou PCR. Jeli poměr výrazně nižší jako například u vzorků 18, může to znamenat přítomnost bílkovin, fenolu nebo jiných kontaminantů. Poměr

260 nm a 230 nm se používá jako sekundární míra čistoty nukleových kyselin. Hodnoty pro tuto absorbanci se pohybují výše než hodnoty pro absorbanci 260/280 nm, obvykle se pohybují mezi 2-2,2, což splňují jen některé naše hodnoty. Je-li toto číslo menší značí to přítomnost uhlohydrátů ve vzorku, což se u rostlin stává často. Je patrné, že vzorek číslo 21 byl ovlivněn přítomností RNA, protože v druhém měření došlo k velkému úbytku koncentrace DNA (tab. 5). Rozdíl u tohoto vzorku lze vidět i na srovnání 1% agarózových gelů (obr. 14 a obr.15).

### 5.3. PCR

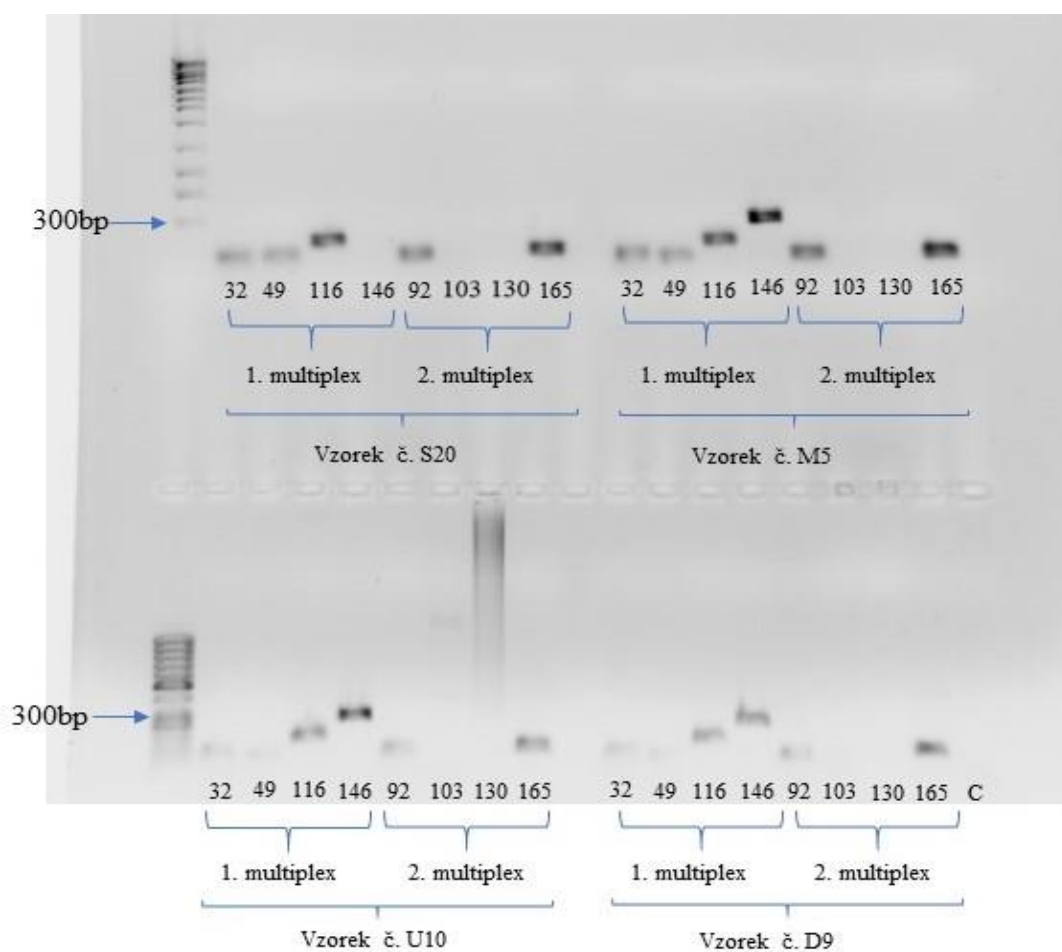
Při předběžném testování mikrosatelitových úseků byly nalezeny rozdíly při elektroforetické separaci v délce fragmentů, ale přesnější detekce genetické variability bude stanoveno až po vyhodnocení polymorfismu vzorků všech studovaných lokalit pomocí fragmentační analýzy a následném statistickém vyhodnocení. Jedná se o předběžné výsledky variability, které vyplynuly z optimalizace mikrosatelitových markerů, ve kterých se bude nadále pokračovat.

Z obrázku 16 můžeme usuzovat, že to vypadá na variabilitu mezi populacemi. Můžeme vidět rozdíly mezi Krkonošskými populacemi v Horních Mísečkách (na obrázku pod písmenem H) a v Úpě (na obrázku pod písmenem U) a populacemi ve Švýcarsku (na obrázku pod písmenem S a D). Na vzorcích z populace z Horních Míseček lze vidět i variabilitu v rámci jedné populace. Prostřední proužek je patrně níže než zbylé dva. Variabilitu jsme pozorovali i na ostatních vzorcích.



Obr 16: Viditelná variabilita mezi vzorky při použití primerů 92 a 103. Jako žebřík byl použit GeneRuler 50 bp. Kódy vzorku jsou uvedeny v tabulkách 2 a 5.

Na obrázku 17 lze vidět ilustrativní gel pro 4 vzorky. Každý z vzorků pokrývá oba multiplexy. Multiplex 1 a multiplex 2 amplifikoval správně, požadované produkty jsou viditelné a odpovídají velikosti fragmentů, které jsou zmíněné v tabulce 3. Velikosti fragmentů se pohybovaly od 103 do 317. Požadované produkty byly vidět i na gelu pro ostatní vzorky.



Obr. 17: Výsledné produkty PCR. Čísla 32-165 uvádí označení primerů. Písmeno C na gelu značí kontrolní vzorek. Jako první byl použit žebřík HighRanger 1kb, jako druhý byl použit žebřík GeneRuler 50 bp.



## 6. Diskuze

V současné době je šťovík alpský považován za vytrvalou invazní rostlinu (Šťastná 2009). Všechna doporučení, jak nakládat s touto rostlinou vycházejí z různých studií. Bucharová (2003) ve své práci uvádí managementová doporučení, jakým způsobem regulovat výskyt této rostliny v ekosystémech. Z této studie vyplývá, že jde o metody dlouhodobé a finančně i časově náročné. Studie Červenkové (2008) a Říčařové (2011) vyhodnotily vzdálenost a dobu šíření šťovíku alpského. Konkrétně tyto studie byly provedeny v Krkonoších. Zcela zde chybí studie, která by se zaměřila na genetickou diverzitu tohoto druhu.

Podle Šurinové a kol. (2017) bylo vyvinuto 15 mikrosatelitových sekvencí pro šťovík alpský. K optimalizaci mikrosatelitových markerů bylo vybráno 8 mikrosatelitových sekvencí, které odpovídaly rozsahu velikosti produktů PCR podle Šurinové a kol. (2017). I když požadované produkty PCR byli vidět na 1% agarózovém gelu, bylo by dobré podle Schuelke (2000) upravit množství komponentů pro PCR reakci pro následné analýzy genetické variability. To znamená snížit množství forwardového primeru v reakci, aby se v druhém cyklu PCR správně navázal na produkty univerzální FAM primeru M13, který je komplementární pro další fluorescenční barviva (VIC, PET a NED).

Mezi zkoumanými populacemi byla zjištěna potencionální variabilita vzorků, a to jak mezi populacemi z Krkonoš a Švýcarských Alp tak i mezi populacemi v rámci jednotlivých geografických celků. Tyto rozdíly mohou být způsobeny pravděpodobně velkou vzdáleností mezi zkoumanými oblastmi. Velká vzdálenost a geografická bariéra Alp mohla způsobit diversifikaci mezi zkoumanými populacemi. Aby se tato teorie mohla potvrdit nebo vyvrátit bylo by vhodné rozšířit zkoumanou oblast

## 7. Závěr

V této práci byla provedena optimalizace mikrosatelitových markerů na vzorcích šťovíku alpského z České republiky a Švýcarska. Podle literární rešerše je šťovík alpský původním druhem ve vysokohorských oblastech Alp, Karpat a Pyrenejí. Na našem území je znám jako nepůvodní rostlina. Mezi vzorky byla zjištěný trend, kde je patrné že vzorky sesbírané z Krkonoš se značně liší od vzorků sesbíraných ve Švýcarských Alp. Dále byl pozorován trend i mezi Krkonošskými populacemi.

Z výsledků můžeme usoudit, že v našich podmínkách, ale i porosty šťovíku alpského ve Švýcarsku tvoří klonální společenství. V rámci populace se rozmnožují i generativně. Tím tvoří mnohem variabilnější společenství, ale jedná se jen o předběžný výsledek, který potvrdí nadcházející studie na genetickou variabilitu šťovíku alpského.

## 8. Literatura

AOPK ČR. ©2016: Výskyt druhu *Rumex alpinus* v jednotlivých periodách podle záznamů v Nálezové databázi ochrany přírody (online) [cit.2018.02.18], dostupné z <[http://portal.nature.cz/publik\\_syst/nd\\_nalez-public.php?idTaxon=39396](http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=39396)>.

Balloux F., Lugon-Moulin N. 2002: The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155–165.

Bhargava A., Fuentes F. F. 2010: Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44(3): 250-266.

Bucharová A. 2003: *Rumex alpinus* v Krkonoších – rozšíření a management. Karlova univerzita v Praze, Katedra botaniky, (diplomová práce).

Červenková Z. 2007: Invaze druhu *Rumex alpinus* v Krkonoších na krajinné úrovni. Karlova univerzita v Praze, Katedra botaniky, (diplomová práce).

Danihelka J., Chrtek J., Kaplan Z. 2012: Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia*. Roč. 84, čís. 3, s. 647-811.

Doležel J., Greilhuber J., Suda J. 2007: Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2(9):2233-44.

Doyle J.J., Doyle J.L. 1987: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.

Fornůstková A. 2007: Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopýřů. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Brno. 23 s. (bakalářská práce).

Handlová V. 2003: Semenná banka Krkonošských luk. Karlova univerzita v Praze, Katedra botaniky, (diplomová práce).

Holub M. 1986: Agrobiologie druhu *Rumex obtusifolius* L., disertační práce, Katedra Botaniky, UK v Praze, Botanický ústav AV ČR Průhonice.

Janata T. 2010: Šťovík, časopis Krkonoše-Jizerské hory 2010/5.

- Jarolímek I., Kliment J. 2004: Nitrofilné širokolisté vysokobylinné společenstva v horskom a podhorskom stupni Nízkých Tatier. Správa Národného parku Nízke Tatry, Banská Bystrica, pp. 147-570.
- Klimeš L. 1992: The clone architecture of *Rumex alpinus* (*Polygonaceae*). *Oikos*.
- Klimeš L., 1993: Morfometrie listů *Rumex crispus*, *R. obtusifolius* a jejich křížence (*R. x pratensis*). *Preslia*. Praha, 65: 219–224.
- Kočárek E. 2007: Molekulární biologie v medicíně. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů, Brno.
- Kubát K. 2002: Klíč ke květeně České republiky. Praha: Academia.
- Kumar P., Gupta V.K., Misra A.K., Modi D.R., Pandey B.K. 2009: Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal* 2: 141-162.
- Kypr J. 1999: Prodlužování DNA a mikrosatelity. *Vesmír* 78: 328–329.
- Lysková L. 2008: Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta, Brno. 45 s. (bakalářská práce).
- Málková J. 2000: Geobotanická studie vegetačního krytu u bývalé Klínovky v Krkonoších. *Východočeský Sborník Přírodovědný – Práce a studie*, Pardubice 8: 183–213.
- Martinková Z., Honěk A. 2001: Regeneration of *Rumex obtusifolius* L. a er cutting. *Plant Production (Rostlinná výroba)*, 47 (5): 228–232.
- Metody analýzy mikrosatelitů 2017: Analýza mikrosatelitů, katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta jihočeské univerzity (online) [cit.2018.02.18], dostupné z <<http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/mikrosatelity.html>>.
- Ondrák A. 2014: Biologie, výskyt a metody regulace plevelů na trvalých travních porostech. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, (diplomová práce).
- Otto F. 1992: Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. In: Radbruch A, ed. *Flow cytometry and cell sorting*. Berlin: Springer-Verlag, 101–104.

- Raycheva T., Denev I., Dimitrova D. 2013: Taxonomic relationships of selected Bulgarian species from *Rumex* subg. *Rumex* (Polygonaceae) based on ISSR markers. *Phytologia Balcanica* 19: 29–37.
- Rentaría A.M. 2007: Breve revisión de los marcadores moleculares. Eguiarte L., Souza V.V., Aguirre X editors. *Ecología molecular*. Mexico D.F: Instituto Nacional de Ecología, p541-562.
- Řičařová V. 2011: Dálkové šíření *Rumex alpinus*. Karlova univerzita, Katedra botaniky, (diplomová práce).
- Semang K., Bjornstad A., Ndjioudjop N. 2006: An overview of Molecular Marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2540-2568.
- Schuelke M. 2000: An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Schustler F. 1918: Krkonoše. *Archiv pro přír. výzkum Čech*. 16.
- Suda J. 2005: Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií? *Živa* 53/1: 46-48.
- Šmarda J., Šeda Z., Chládek F., Kunert J., Ondráčková F. 1963: Druhotná rostlinná společenstva v Tatranskom národnom parku, *Knížnica sborníka prác o Tatranskom narodnom parku*.
- Šťastná P., Klimeš L., Klimešová J. 2009: Biological flora of Central Europe: *Rumex alpinus*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*.
- Šurinová, M., Jarošová A., Münzbergová Z. 2017: Microsatellite markers for study of the invasive species *Rumex alpinus* (Polygonaceae) (in the review procedure).
- USDA. 2006: What is a genetic marker? (online) [cit.2018.3.20], dostupné z <[https://dendrome.ucdavis.edu/ctgn/files/Vol\\_05\\_print.pdf](https://dendrome.ucdavis.edu/ctgn/files/Vol_05_print.pdf)>.
- Vieira M.L.C., Santini L., Diniz A.L., Munhoz C.F., 2016: Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetic and Molecular Biology*, 39(3): s. 312–328.
- Vierstraete A., 1999: Principle of the PCR (online) [cit.2018.3.18], dostupné z <<https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.

Vítek O. 2005: Vliv cestní sítě na vegetaci subalpínského stupně Krkonoš, disertační práce, Ústav pro životní prostředí, Univerzita Karlova v Praze.

Wagenitz G. 1981: Illustrierte flora von Mitteleuropa. Publischer. Kap. *Polygonaceae*.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. 1995: DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. Boca Raton: CRC Press. 1–3 p.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535.