



**Analýza genetické variability jírovce maďalu pomocí  
DNA markerů**  
Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Bc. Václav Bačovský

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Analýza genetické variability jírovce maďalu pomocí DNA markerů** vypracoval samostatně, a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

## **Poděkování**

Poděkování patří v první řadě mojí rodině, za umožnění a podporu během mého studia, a mé přítelkyni, která mi byla během zpracovávání silnou oporou a motivací.

Za odborné vedení, cenné připomínky a velkou trpělivost patří velký dík mému vedoucímu diplomové práce Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D., a odborné konzultantce Ing. Heleně Vlašínové, Ph.D. Za pomoc při molekulárních analýzách a sekvenování patří velký dík i Ing. Pavlu Hanáčkovi, Ph.D.

Ing. Josefu Mertelíkovi, CSc. chci poděkovat za umožnění četných konzultací, poskytnutí genetického materiálu a cenných rad.

V neposlední řadě patří velké poděkování doc. Ing. Ivaně Šafránkové, Ph.D. za umožnění analýzy listové plochy a rovněž za mnohé rady při volbě materiálu v této práci.

Za pomoc při pořizování fotodokumentace patří toto poděkování i mým blízkým a kamarádům.

## **Abstrakt**

### **ANALÝZA GENETICKÉ VARIABILITY JÍROVCE MAĎALU POMOCÍ DNA MARKERŮ**

Někteří ze zástupců rodu *Aesculus* jsou každoročně silně infestováni klíněnkou jírovcovou (*Cameraria ohridella*), jejíž larvy minují v listech hostitelských dřevin a dokáží poškodit v příhodných podmínkách až 100% listové plochy. U napadených stromů dochází vlivem snížené obranyschopnosti k invazi houbových (*Erysiphe flexuosa*, *Guignardia aesculi*) a bakteriálních (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*) patogenů, a později dochází k vysoké mortalitě u infikovaných jedinců. V této práci byla studována genetická diverzita *A. hippocastanum*, *A. turbinata*, *A. glabra*, *A. parviflora*, *A. glabra* var. *arguta*, *A. x carnea*, *A. marilandica*, *A. pavia* a jejich genotypů s rozdílnou náchylností ke klíněnce jírovcové. Analýzou 8 mikrosatelitních lokusů, s využitím SB pufru během separace, byla zjištěna vysoká hodnota polymorfního informačního obsahu 0,45 – 0,77 (v průměru 0,60). Na jeden lokus bylo identifikováno v průměru 5,5 alely. Za dvě vegetační období bylo zároveň programem Assess 2.0 vyhodnoceno poškození listové plochy u náchylných genotypů. Na každé lokalitě byl zjištěn rozdílný tlak a rozdílný vývoj klíněnky, v některých případech bylo zaznamenáno menší poškození, u jednoho jedince dokonce opakovaně. Z uvedených výsledků byla stanovena stupnice napadení a zhotoven dendrogram podobnosti, kde byly rozlišeny tři skupiny rezistentních, náchylných a imunních jedinců, a 5 hlavních sekcí rodu *Aesculus*. Klonováním a následnou analýzou vnitřních transkribovaných mezerníků, ITS1 a ITS2, byla zjištěna variabilita na vnitřní i mezidruhové úrovni. Pro hybridní druh *A. x carnea* byly získány unikátní sekvence, když nebyla nalezena shoda v genové databázi NCBI pro žádný z uvedených druhů.

**Klíčová slova:** *Aesculus*, rezistence, genetická diverzita, SB pufr, SSR, klonování, ITS

## **Abstract**

### **THE ANALYSIS OF HORSE CHESTNUT GENETIC VARIABILITY USING DNA MARKERS**

Some species of the genus *Aesculus* are every year heavily infested by horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*), whose larvae are mining the leaves, and under appropriate conditions may damage up to 100% of the leaf area. The effect of lower defense capability of infested trees lead to invasion of fungal (*Erysiphe flexuosa*, *Guignardia aesculi*) and bacterial (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*) pathogens, and later to higher mortality of infected individuals. In this study were measured the genetic diversity of species *A. hippocastanum*, *A. turbinata*, *A. glabra*, *A. parviflora*, *A. glabra* var. *arguta*, *A. x carnea*, *A. marilandica*, *A. pavia*, and their genotypes with different susceptibility to the leaf miner. Analysis of 8 microsatellite loci, using the SB buffer for separation, showed high polymorphic information content 0.45 – 0.77 (0,60 in average) and high genetic diversity. For each loci was found average 5.5 aleles. During two vegetation period, leaf area damage of these genotypes was evaluated in statistical software Assess 2.0. Different pressure of leaf miner and different development at each locality was recorded, and even in some cases lower damage was found, in one case it occurred permanently. According to the data obtained, the pathological scale was established and the dendogram of similarity was created. Three groups of resistant, non – resistant and immune individuals were distinguished and five main section of *Aesculus* was found. By cloning and analysing the inner transcribed spacers, ITS1 and ITS2, inner and inter species variability was examined. For the sequence of hybrid species *A. x carnea* no compliance was found in NBI, therefore first sequence of this genotype was obtained.

Key words: *Aesculus*, resistance, genetic diversity, SB buffer, SSR, cloning, ITS

## OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Cíle diplomové práce .....	10
3	Literární přehled.....	11
3.1	Rod <i>Aesculus</i> .....	11
3.1.1	Sekce rodu <i>Aesculus</i> .....	11
3.1.2	Vybraní zástupci rodu <i>Aesculus</i> .....	12
3.2	Genetická diverzita a variabilita.....	14
3.2.1	Možnosti tvorby genetické variability a její ochrana .....	14
3.2.2	Možnosti studia genetické diverzity.....	15
3.3	Morfologické markery .....	15
3.4	Biochemické markery .....	16
3.5	DNA markery.....	16
3.5.1	Hybridizační markery.....	17
3.5.2	Klonování DNA .....	18
3.5.3	Amplifikační markery .....	20
3.5.4	Markery založené na amplifikaci náhodných fragmentů .....	21
3.5.5	Markery založené na amplifikaci specifických fragmentů.....	22
3.5.6	Simple Sequence Repeat (SSR) .....	23
3.6	Sekvenační markery .....	26
3.6.1	Sekvence vhodné pro fylogenetické analýzy .....	27
3.6.2	Ribozomální jaderná DNA.....	28
3.6.3	Chloroplastová DNA.....	30
3.6.4	Ostatní sekvence využívané pro fylogenetické studie.....	31
3.7	Elektrolytické pufrы a DNA markery.....	32
3.7.1	Vlastnosti elektrolytických pufrů .....	32
3.7.2	Pufry využívané v současné době .....	33
3.7.3	Využití alternativních pufrů při elektroforéze.....	34
4	Materiál a metodika.....	36
4.1	Kolekce jírovců .....	36
4.2	Rostlinný materiál .....	36
4.3	Izolace DNA .....	39
4.4	Protokol PCR mikrosatelitů .....	39
4.5	Protokol PCR nrDNA .....	40
4.5.1	Hodnocení čistoty ITS fragmentů a purifikace .....	41
4.6	Klonování.....	41

4.6.1	Ligace.....	42
4.6.2	Elektroporace a kultivace.....	42
4.6.3	Testování úspěšnosti transformace pGEM-T vektorů.....	43
4.7	Sekvenování.....	44
4.8	Testování SB pufru a jeho složení.....	44
4.9	Hodnocení rezistence.....	45
5	Výsledky.....	48
5.1	Poškození jírovců v podmínkách umělé infestace.....	48
5.2	Poškození jírovců v přirozených podmínkách.....	48
5.3	Vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů.....	54
5.4	Vyhodnocení genetické diverzity analyzovaných jedinců.....	56
5.5	Srovnání alternativních pufrů během elektroforetické separace.....	59
5.6	Vyhodnocení klonovací reakce.....	60
5.7	Analýza získaných sekvencí.....	62
6	Diskuse.....	68
7	Závěr.....	72
8	Literární zdroje.....	74
9	Seznam grafů, obrázků a tabulek.....	83
9.1	Seznam grafů.....	83
9.2	Seznam obrázků.....	83
9.3	Seznam tabulek.....	83

## 1 ÚVOD

Do rodu *Aesculus* patří celá řada významných druhů, které mají velmi bohatou historii datovanou již od 16. století. Tyto dřeviny a keře jsou využívány pro své okrasné a užitkové vlastnosti, v lesnickém průmyslu zejména jako výživa spárkaté zvěře a ve farmacii při výrobě léčiv. Rovněž jsou druhy rodu *Aesculus* hojně využívány v dřevařském průmyslu díky lehké zpracovatelnosti jejich dřeva. V městské zeleni plní významnou úlohu díky jejich vysoké odolnosti ke stresovým faktorům abiotického původu (Russel, 2005). Bohatá koruna pomáhá při snižování prašnosti a hlučnosti ve městech.

Na konci minulého století byl do střední Evropy zavlečen rychle se šířící fytofág klíněnka jírovcová (*Cameraria ohridella*), jejíž larvy způsobují těžká poškození na listech jírovců, a to zejména u jírovce maďalu (*A. hippocastanum* L.) a jírovce japonského (*A. turbinata* Blume) (Nováková, 2008). Klíněnka jírovcová je drobný motýl, který v našich podmínkách vytváří až 3 generace ročně, včetně přezimující populace. Každoroční populace tohoto škůdce je dosažena schopností kukel prolongace diapauzy až na dva roky. Bylo zjištěno, že při nedostatku potravy téměř celá druhá generace dokončuje svůj vývoj v dalších letech. Nedochozí proto ke gradačnímu kolapsu, jak je tomu u ostatních druhů (Šefrová, 2002). Škodlivost housenek klíněnky spočívá v jejich žíru, kdy již v polovině vegetačního období dochází k téměř kompletnímu poškození palisádového parenchymu. Dochází tím ke změně vodního systému rostliny a významnému omezení fotosyntézy. Ačkoli je houbový parenchym stále schopen částečné fotosyntetické asimilace, je do značné míry omezena obranyschopnost napadených jedinců. Líhnutím larev a oxidací poškozených pletiv navíc vzniká vstupní brána pro houbové a bakteriální patogeny. Mezi běžně se vyskytující patří *Erysiphe flexuosa*, *Guignardia aesculi* (Pešková & Soukup, 2009; Tozlu & Demirci, 2010) a *Glomeria cingulata* (Chanon, 2005). Nejzávažnějším patogenem je však bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*, která se postupně šíří v západní Evropě, a způsobuje spolu s klíněnkou jírovcovou a uvedenými houbovými patogeny masový úhyn napadených jedinců (Steele *et al.*, 2010).

Možností regulace výše uvedených škodlivých faktorů biotického původu je dnes celá řada, avšak v případě klíněnky jírovcové není umělá regulace příliš účinná. Kontaktní nebo i systémové insekticidy jsou cenově náročné a často pouze na jedno



vegetační období. Mechanické odstranění opadaných listů posouvá počátek infestace až o 14 dní.

Jako účinná regulace tohoto škůdce se nabízí využití přirozené rezistence. V roce 1998 byl nalezen jedinec vykazující vysokou úroveň odolnosti ke klíněnce jírovcové, který je dnes registrován jako Mertelik06 (M06) pod registračním číslem 296896 (Mertelík & Kloudová, 2006). Na tomto jedinci dochází k zastavení vývoje larev v důsledku žíru jeho listových pletiv (Mertelík & Kloudová, 2009). Jedná se tedy o antibiózu, která je způsobená produkcí a zvýšenou přítomností sekundárních metabolitů jako je escin, kyselina chlorgenová a diglykosid kverticinu. U jedinců, kteří jsou náchylní, se jedná o toleranci.

U některých druhů jírovce došlo k určité genetické stagnaci v důsledku dlouhého růstu, nedávným rozšířením a demografickými událostmi na konci čtvrtohor. Noví jedinci nejsou vysazováni náhodně, a nedochází proto k volné alelové rekombinaci. Pro takovéto druhy je nutné studium genetické variability a diverzity, která je spojená i s jejich ochranou.

Ke studiu genetické diverzity dnes existuje celá řada metod a nástrojů, které lze rovněž využít jak pro studium rezistence, tak i k identifikaci původu jednotlivých druhů. Tato práce navazuje na předchozí práci (Bačovský, 2013), s rozšířením o nové metody a nástroje pro získání více informací o vztazích mezi jírovci navzájem, porozumění systému fytofág – hostitel (*Cameraria ohridella* – *Aesculus hippocastanum*), a schopnosti vybraných jedinců rodu *Aesculus* odolávat biotickému stresu ve vybraných podmínkách.

## **2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

- 1) Literární rešerše na studium genetické diverzity rostlin pomocí DNA markerů
- 2) Hodnocení poškození listové plochy larvami klíněnky jírovcové u vybraných genotypů rodu *Aesculus*
- 3) Molekulární analýza hodnocených genotypů pomocí SSR markerů
- 4) Molekulární analýza variability vnitřních transkribovaných mezerníků ITS1 a ITS2
- 5) Účinnost alternativních elektrolytických pufrů při analýzách DNA
- 6) Statistické zpracování získaných výsledků a jejich interpretace

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Rod *Aesculus*

Rod *Aesculus* je tradičně rozdělován do pěti hlavních sekcí, které odrážejí geografickou distribuci jednotlivých druhů i jejich podobnost v rámci fylogenetických analýz. Jsou to sekce *Aesculus*, *Pavia*, *Parviflora*, *Calothyrsus* a *Macrothyrsus*. Tento malý rod, vyskytující se na severní polokouli v severní a severovýchodní Americe, Evropě, východní Asii a Japonsku, je dobře prostudovaný fylogenetickými nástroji, a to díky své velikosti, bohatým fosilním nálezům a zastoupením jednotlivých druhů na různých lokalitách (Harris, 2007).

##### 3.1.1 Sekce rodu *Aesculus*

Jak již bylo zmíněno, rod *Aesculus* se člení na pět hlavních sekcí a sekci *Hybrid*, která je často v literatuře opomíjena (Xiang *et al.*, 1998; Chanon, 2005; Harris, 2007):

1. Sekce *Aesculus* je rozdělena do dvou oblastí, a zahrnuje již dva zmíněné druhy *A. hippocastanum* a *A. turbinata*. Centrum původu jírovce maďalu je okolí Ohridského jezera, odkud byl distribuován na konci 16. století do celé Evropy. Dnes se tento druh nachází téměř na celém evropském kontinentu, s územím zasahujícím až do východní Asie. Jírovec japonský byl nalezen na třech japonských ostrovech Honšú, Šikoku a Hokkaidó. Dnes se však běžně vyskytuje i na ostatních kontinentech.
2. Sekce *Pavia* je jedna ze tří polytypických sekcí (obsahuje alespoň dva a více poddruhů) a patří k ní druhy *A. glabra* Willd., *A. glabra* var. *arguta* Rob., *A. flava* Sol., *A. pavia* L., *A. pavia* var. *flavescens* Sargent, a *A. sylvatica* Bartram. Původní oblasti těchto druhů se často překrývají a zahrnují území států USA - Texas, Kansas, Alabama, Karolina a Florida.
3. V sekci *Calothyrsus* se vyskytují druhy *A. assamica* Griff., *A. californica* Spach., *A. chinensis* Bunge, *A. indica* Wall. ex Camb. a *A. wilsonni* Rehder. Všechny druhy se vyskytují ve východní Asii s původem v himalájských oblastech, kromě *A. californica*, který byl objeven v nevadských horách v Severní Americe.
4. *A. parviflora* Walter (sekce *Macrothyrsus*) byl popsán a objeven v USA ve státě Georgia.
5. *A. parryi* Gray (sekce *Parryina*) je jeden z amerických jírovců, vyskytující se převážně v Kalifornii.

6. Hybrid sekce představuje *A. x carnea*, *A. x anoldiana*, *A. x bushii*, *A. x hybrida*, *A. x mutabilis*, *A. x neglecta*, *A. x plantierensis* a *A. x woerlitzensis*.

### 3.1.2 Vybraní zástupci rodu *Aesculus*

Předmětem této práce není shrnutí dosavadních poznatků o rodu *Aesculus*, proto jsou nadále uvedeny jen druhy analyzované v této práci. V tabulce 1 je uvedena náchylnost jednotlivých druhů k biotickým a abiotickým faktorům, které se běžně vyskytují v lokalitách výskytu těchto jedinců. V tabulce 2 lze nalézt anatomické a morfologické rozdíly u osmi druhů v této studii.

**Tabulka 1 - Náchylnost a tolerance vybraných druhů ke stresovým faktorům (upraveno Chanon, 2005)**

Druh/typ stresu	Biotický stres		Abiotický stres	
	Tolerance	Náchylnost	Tolerance	Náchylnost
<i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>C. ohridella</i> (rezistentní kultivar M06)	<i>E. flexuosa</i> , <i>G. aesculi</i> (+), <i>G. cingulata</i> , <i>C. ohridella</i> (+/+++), <i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	Zasolení (+), znečištění ovzduší, těžké půdy	Spálené listy
<i>Aesculus turbinata</i>	x	<i>Guignardia aesculi</i> (-), <i>Cameraria ohridella</i> (+/+++)	Sucho (-)	
<i>Aesculus marilandica</i>	<i>Guignardia aesculi</i> (některé genotypy)	<i>Guignardia aesculi</i> (-/+)	Sucho (-)	Nízké teploty během jara
<i>Aesculus parviflora</i>	<i>Guignardia aesculi</i> , ostatní listové choroby	x	Zamokření	Sucho
<i>Aesculus glabra</i>	x	<i>E. flexuosa</i> , <i>G. aesculi</i> (+), <i>G. cingulata</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	Zasolení půdy, alkalické soli, sucho, znečištění ovzduší	x
<i>Aesculus glabra</i> var. <i>arguta</i>	<i>Guignardia aesculi</i>	x	Alkalické zasolení	x
<i>Aesculus pavia</i>	x	x	Zamokření	x
<i>Aesculus x carnea</i>	x	<i>Guignardia aesculi</i> (+)	Znečištění ovzduší (+)	x

Vysvětlivky: (-/+ /++) – slabá, silná a extra silná náchylnost nebo tolerance; x – neověřeno

**Tabulka 2 – Anatomická a morfologická charakteristika vybraných jedinců rodu *Aesculus* (upraveno Chanon 2005)**

Druh	Výška (m)	Šířka koruny (m)	Borka	Listy (četnost)	Tvar a povrch listů	Květenství a barva	Plody
<i>Aesculus hippocastanum</i>	12 - 25 (až 35)	15	Hladce destičkovitá, načervenalá, šedobíleá	7 (5, 9)	Pilovité, obvejčité; na počátku vegetace světle zelené, na rubu narezavělé	4 - 5 bílých, červenožlutých okvětních plátek s pyramidovou strukturou	5 - 6 cm, temně hnědé, 1 - 3 na poutku
<i>Aesculus turbinata</i>	30 - 40	15	Hladce destičkovitá, našedivělá	5 - 7	Obvejčité až celokrajné, rovnoměrně vroubkované; na rubu nasivělé	Krémově bílé se žlutými, postupně červenajícími skvrnami, cylindrický tvar	5 cm, šedý nádech, 3 na poutku
<i>Aesculus marilandica</i>	25 - 30	10	Rozpraskaná s věkem, šedivě hnědá	5 - 7	Úzké podlouhlé až vejčité, jemně pilovité; lesklé, s trichomy podél žilek	Bílé štíhlé až cylindrické květy, tyčinky delší než okvětní plátky	2 - 5 cm, žlutohnědé, 2 na poutku
<i>Aesculus parviflora</i>	2 - 4	4 - 5	Hladká, světle šedá	5 - 7	Eliptický, oválný nebo obvejčité; hladké jemně pilovité; řapík vínové barvy, listy tmavě zelené	Bílé sloupovité květy, tyčinky mnohonásobně delší než okvětní plátky (3 - 4x)	2,5 - 4 cm, světle hnědá se šedým nádechem, 1 - 3 na poutku
<i>Aesculus glabra</i>	10 - 20	6 - 7	Velmi drsná a popraskaná, temně šedá	5 (7)	Obvejčité až vejčité, jemně pilovité; lysé listy, matně zelené	Světle žluté, kuželovité květy se stejně velkými okvětními plátky (4) jako tyčinky (5 - 8)	2,5 - 5 cm, 2 - 3 (5) na poutku, bronzová barva
<i>Aesculus glabra</i> var. <i>arguta</i>	4 - 6	6 - 7	Velmi drsná a popraskaná, temně šedá	7 - 9 (11)	Kopinaté, zužující se na špičce, hluboce / hrubě pilovité lysé listy, matně zelené	Světle žluté (až do zelena) kuželovité květy se stejně velkými okvětními plátky (4) jako tyčinky (5 - 8)	2,5 - 5 cm, 2 - 3 (5) na poutku, bronzová barva
<i>Aesculus pavia</i>	5 - 8 (10)	3 - 4	Hladká, světle šedá až šedivě hnědá	5 - 7	Podlouhlé až obvejčité, nepravdělně dvakrát pilovité; lysé listy, tmavě zelené	Tmavě červené květy se žlutými skvrnami v horní polovině, tyčinky podobně dlouhé, jako okvětní plátky, květenství rozsýpavé	2,5 - 7,5 cm, světle hnědé, 1 - 5 na poutku
<i>Aesculus x carnea</i>	10 - 15 (20)	x	Světle hnědá, jemně rozpraskaná	5	Tmavě zelené, tuhé se zvlněným okrajem	Tmavě růžové	3 - 4 cm, velmi řídké ostnitě

## **3.2 Genetická diverzita a variabilita**

Pojem genetická diverzita znamená genetickou různorodost, nebo také rozmanitost na úrovni druhů (jejich stupeň odlišení na úrovni nukleových kyselin). Genetická variabilita představuje detailnější stupeň proměnlivosti, poznatky této variability poskytují cenné informace o vnitrodruhové genetické různorodosti. Oba tyto ukazatele jsou součástí mnohem ucelenějšího systému biodiverzity, která zahrnuje všechny typy rozmanitosti, ať už na úrovni ekosystémů nebo i jednotlivých populací (Laštůvka & Krejčová, 2000). I když genetická diverzita, společně s genetickou variabilitou, stojí na nejnižším a základním stupni celého systému biodiverzity, mají na celkovou rozmanitost největší vliv. Jsou základem evoluce a schopnosti přizpůsobení se živých organismů novým podmínkám. Jde tedy o různorodost v rámci jednoho druhu, nebo mezi druhy navzájem, která je geneticky fixována (Rands *et al.*, 2010).

Druhy a ekosystémy, které vykazují vysoký stupeň homogenity (mají nízkou úroveň genetické proměnlivosti), jsou více geneticky zranitelné, mají sníženou ekologickou adaptabilitu, a s ní spojenou nižší odolnost ke stresovým podmínkám biotického i abiotického původu. Rostliny jsou, na rozdíl od živočichů, omezené nemožností úniku v případě nepříznivých podmínek. Musejí být schopny reagovat na tyto nové podmínky a musí se jim umět přizpůsobit. Tato přizpůsobivost samozřejmě vyžaduje vysokou úroveň flexibility v průběhu evoluce.

### **3.2.1 Možnosti tvorby genetické variability a její ochrana**

V rámci ochrany genetické diverzity a variability by měl být kladen důraz na její poznatky nejen u postižených a ohrožených druhů. Dle Patona (2009), studium genetické rozmanitosti na úrovni mezi- a vnitrodruhové bude mít čím dál větší význam nejen pro základní výzkum pro zabezpečení potravinové soběstačnosti lidstva, ale i pro teorii udržitelného rozvoje (TUR). V práci Bačovský (2013) je uveden širší význam genetické rozmanitosti společně s důsledky jejího ochuzování.

Rozšiřování genetické variability se provádí především u významných, hospodářsky využitelných druhů, přičemž jsou ovlivňovány jejich kvalitativní a kvantitativní vlastnosti. Vyšší genetické variability lze dosáhnout dle Chloupka (2008) u rostlin několika způsoby: 1) křížením (rekombinace vlastností výchozího materiálu k získání rostlin s projevem heteroze); 2) mutagenezí (tj. náhlá změna genotypu, která je způsobená cílenou mutací v určitém nebo náhodném lokusu); 3) polyploidizací (jeden z druhů mutace, kdy se např. aplikací kolchicinu zvýší základní chromozomové číslo na dvojnásobek); 4) biotechnologickými postupy (fúze buněk, kdy dochází ke splynutí

protoplastů; selekce v buněčných kulturách, tedy výběr mutantních rostlin odvozených z kalusových kultur, buněčných suspenzí nebo protoplastů); 5) genovými transformacemi (vnášení cizorodé DNA do cílového organismu); 6) ostatními zdroji genetické variability (ty zahrnují genové amplifikace a interakce, transpozony a epigenetické mutace, které nejen pro rostliny znamenají jeden z hlavních mechanismů možností adaptace při stresových podmínkách)

Zdroji genetické variability jsou druhy nedomestikované, vyskytující se v místě jejich původu. Ochranu genetické proměnlivosti v rámci druhů představuje její konzervaci *in situ* a *ex situ*.

### **3.2.2 Možnosti studia genetické diverzity**

Ke studiu genetické proměnlivosti se dnes využívá zejména genetických znaků. Genetický znak (marker) představuje jakýkoli fenotypový projev, při kterém se alely příslušného genu segregují na určitém lokusu dle Mendelových zákonů. Genetické markery tak umožňují studium rozmanitosti u jednotlivých druhů na úrovni samotných genů. S rozvojem molekulární biologie, především v 70. letech 20. století došlo k objevu celé řady metod, které jsou dnes standardně využívány. Tyto metody lze využít při studiu domestikovaných druhů a jejich předků, k porozumění příčin změn uvnitř těchto populací, umožňují studovat a lépe porozumět procesu křížení, křížení mezi příbuznými jedinci a změnám v genetické expresi. Pomáhají objasnit genetickou variaci způsobenou geografickými událostmi a lze jimi rovněž určit fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy navzájem. Moderní metody také umožňují tvorbu genetických map, efektivnější selekci a identifikaci znaků při šlechtění.

Ke studiu genetické proměnlivosti existuje hned několik metod založených na různých markerech. V této literární rešerši je největší pozornost věnována SSR markerům a ITS oblastem, které jsou i předmětem diplomové práce.

### **3.3 Morfologické markery**

Na úrovni morfologických markerů jsou sledovány jednotlivé znaky v příslušné fázi ontogenetického vývoje. Tyto markery mají výhodu malé náročnosti na technologie. Jednotlivé znaky bohužel ale nemusí být zcela zřetelné, a jsou navíc závislé na prostředí. Morfologicko-taxonická analýza vyžaduje široké zkušenosti a vyžaduje velké množství rostlinných zdrojů. Velkou nevýhodou je pak rozlišovací schopnost u vegetativně množených druhů (Christelová, 2011; Jiang, 2013).

U dřevin, na rozdíl od jiných rostlin, bylo identifikováno pouze malé množství těchto markerů, které bývají pro mutované jedince často letální.

### 3.4 Biochemické markery

Biochemické a molekulární techniky poskytují užitečná data, a to díky jejich schopnosti poskytovat informace o polymorfizmu na nejdetailejší úrovni.

Biochemické markery studují variabilitu, která je způsobena přítomností nebo specifickou modifikací sledovaného proteinu, funkcí enzymů a výskytem sekundárních metabolitů. K rozpoznání genetické variability na úrovni biochemických markerů se nejčastěji využívají elektroforetické separační, imunoanalytické a chromatografické metody. Těmito metodami lze stanovit míru diverzity mezi druhy navzájem, v rámci jednoho druhu nebo až v rámci populace (Jiang, 2013). Rovněž mohou být tyto metody využívány k evolučním studiím, nebo při sledování konzervace genů (Strauss *et al.*, 1992). U dřevin byly nejvíce studovány dominantní markery ze skupiny terpenoidů (monoterpeny), které byly nahrazeny kodominantními allozomy, tedy různými variantami jednotlivých enzymů (neboli izoenzymy) (White *et al.*, 2007). U hospodářských druhů jsou dnes oblíbenými biochemickými markery zásobní proteiny jako gliadiny a gluteiny u pšenice, hordeiny u ječmene a zeiny u kukuřice.

### 3.5 DNA markery

Poslední skupinou znaků, které se zabývají genetickou variabilitou na úrovni nukleotidů, jsou molekulární DNA markery. Tyto markery jsou založeny na sledování polymorfizmů v primární sekvenci DNA. Jejich předností je, že nejsou závislé na vnějším prostředí, na rozdíl od morfologicko-taxonomických a biochemických znaků. Kterákoli změna v sekvenci DNA (inzerce, delece, translokace, duplikace i bodové mutace) může být studována v jakékoli části genomu, která rovněž může být získána z jakékoli části rostliny. Tyto markery jsou však po finanční a technologické stránce nejnáročnější. Jejich využití je rovněž limitováno předchozí znalostí studovaného úseku (Mondini *et al.*, 2009).

Těmito markery byl velmi zjednodušen přístup k poznatkům uvedených v kapitole 3.2.2. Především při šlechtění rostlin a genotypování jednotlivých jedinců jsou znaky na úrovni DNA dnes nezastupitelné.

Výběr vhodného markeru se liší v závislosti na materiálu, který má být studován, a která problematika má být analyzována. Vhodný marker by měl být rovnoměrně zastoupen v genomu, měl by být vysoce polymorfní, zároveň však reprodukovatelný. Rovněž by měl vyžadovat co nejmenší množství vstupní DNA (Agarwal *et al.*, 2008).



Dle typu jsou markery rozlišovány na dominantní a kodominantní. Dominantní markery jsou specifikovány přítomností nebo absencí studované alely, a nelze tedy určit jejich frekvenci. Naproti tomu, kodominantní markery umožňují detekci dominantní i recesivní alely, které jsou předávány potomstvu od obou rodičů (Mishra *et al.*, 2014). Kodominantní markery jsou tedy více specifické. Jejich nevýhoda je jejich jednolokusový výskyt, kde je při jejich analýze nutné znát větší počet úseků. Tento počet je dán polymorfizmem každého lokusu, tedy jeho mutační rychlostí (Vignal *et al.*, 2002).

Na základě metody, na které jsou založeny, lze DNA markery rozdělit do tří skupin: 1) hybridizační, tj. spárování bází na základě jejich komplementarity s připraveným úsekem DNA; 2) amplifikační – amplifikace úseku DNA; 3) sekvenční – získání přesného sledu nukleotidů příslušného fragmentu.

### **3.5.1 Hybridizační markery**

Systém DNA-DNA hybridizace byl objeven v souvislosti se snahou zredukovat velikost eukaryotického genomu pro jeho snadnější manipulaci. Vytváření vodíkových můstků mezi jednotlivými bázemi umožnilo využít malé úseky DNA jako značky při studiu polymorfismu v homologních sekvencích k těmto značkám.

Metoda umožňující takovýto přístup se nazývá délkový polymorfismus restričních fragmentů (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism). Základ této metody je v redukci velikosti celého genomu pomocí restričních endonukleáz, kde velké množství fragmentů, získané z celého jaderného genomu, je redukováno jejich hybridizací k připraveným krátkým úsekům, navázaných například na nylonovou membránu (tzv. DNA hybridizace) (White *et al.*, 2007).

Objevením polymerázové řetězové reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) se tato metoda podstatně zjednodušila. Studovaný úsek zájmu při známé sekvenci je amplifikován, a restriční endonukleáza na základě příslušné sekvence daný úsek štěpí nebo nikoli. Pomocí této metody lze rozlišit homo- i heterozygoty, a zároveň je velmi dobře reprodukovatelná mezi jednotlivými laboratořemi. Technika, kombinující přístupy PCR a RFLP, se nazývá CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Jiang, 2013).

Obě výše uvedené metody jsou dnes nahrazovány efektivnější technologií DArT (Diversity Arrays Technology), která kombinuje prvky RFLP, PCR a AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Při analýze jedinců touto metodou dochází rovněž k redukci velikosti celého genomu, ale mnohem výrazněji. Proto byla metoda DArT

aplikována zejména u polyploidních druhů s velkým genomem, jako ječmen, pšenice, různé druhy trav a rýže (Němcová *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Klonování DNA

Podstatou většiny metod, především využívajících rekombinace DNA, byla (až do objevení polymerázové řetězové reakce) technika klonování, v literatuře také jako klonování DNA nebo klonování genů. Tato metoda je založená na izolaci specifického úseku DNA, který je následně vložen do cizího hostitelského genomu bakteriálního nebo virového původu (plazmidy, viriony, kosmidy) (Zuo & Rabie, 2010).

Při izolaci specifického úseku, který je vložen do vektoru, vzniká tzv. DNA knihovna, která obsahuje alespoň jeden gen nebo analyzovaný fragment DNA. Takto přenesený úsek DNA, lze následně získávat v dostatečném množství a využít pro další studie, dnes nejčastěji sekvenování.

Využití procesu klonování umožnilo objevení zmíněných restrikčních endonukleáz, které dokáží štěpit vlákna nukleových kyselin s přesností na 1 nukleotid. Název restrikční endonukleázy vychází z jejich funkce v bakteriálních buňkách, kde vyhledávají a napadají cizorodou DNA (White *et al.*, 2007). Každá restrikční endonukleáza má svoji specifickou rozpoznávací sekvenci, která je často palindromatická (identická v obou směrech komplementarity). První restrikční enzym s endonukleázovou aktivitou byl nalezen v bakterii *Escherichia coli* (název enzymu *EcoRI*), s rozpoznávací sekvencí GAATTC ve směru 5'3' a CTTAAG ve směru 3'5' (Semagn *et al.*, 2006).

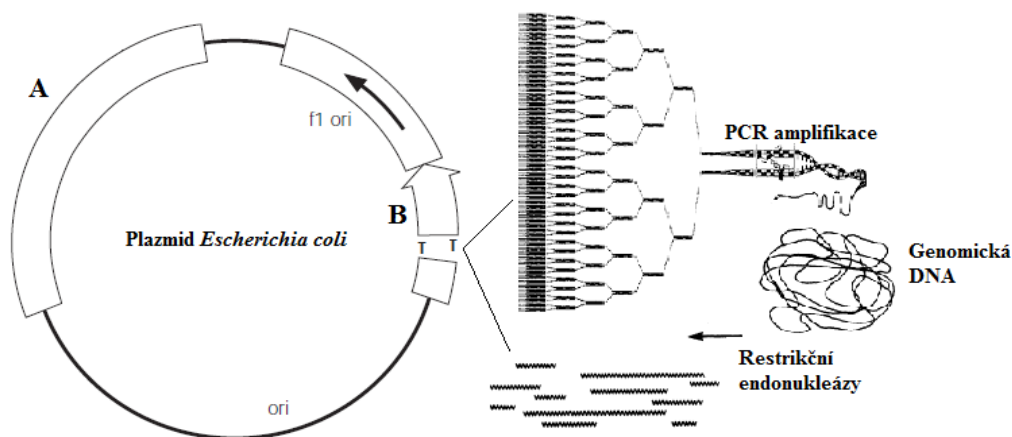
Restrikční endonukleázy lze jednak využít při RFLP a s touto metodou spojených analýzách, a při samotném klonování (obr. 1), které zahrnuje několik základních kroků:

1. Izolace vektorových plazmidů z bakterií – dnes již běžně poskytované komerčně.
2. Restrikce získaného plazmidu v bodě 1 – komerčně dodávané plazmidy jsou geneticky modifikovány, aby obsahovaly co největší počet restrikčních míst. V inzerčním místě vektoru se nachází deoxynukleotidový přesah, nejčastěji ve směru 5'3', který zabraňuje resociaci a zároveň slouží jako vazebné místo pro ligovaný fragment (Bola, 2005).
3. Příprava inzertu – z počátku této metody byl vždy studovaný úsek DNA naštěpen stejným enzymem, který byl aplikován na vektorový plazmid.

*EcoRI* štěpí v místě G a A, nechává tedy na každém místě přesah 4 bází AATT/TTAA. Každá restriční endonukláza má pak specifickou rozpoznávací sekvenci, která se pohybuje nejčastěji v rozmezí 4 – 8 bp (Alberts *et al.*, 2008). Dnes se běžně využívá k získání studovaného úseku PCR, kde termostabilní *Taq* polymeráza během terminální degradace připojuje na 3' konec v obou směrech DNA deoxyadenin. Tento 1 bp přesah slouží jako vazebné místo, které je komplementární k restričnímu místu v hostitelském vektoru, do kterého je příslušný fragment inzertován. Restriční místa rovněž mohou nést i specificky navržené primery (Gansauge & Meyer, 2013).

4. Přečištění – před ligací je často rozhodující pro správný průběh celé reakce získat příslušnou sekvenci ve správném množství a kvalitě. Získaný PCR produkt se zbavuje volných primerů a nukleotidů, které nebyly při amplifikaci spotřebovány. K tomu je dnes využívána celá řada komerčně dodávaných kitů. Hlavními složkami jsou enzymy alkalická fosfatáza a exonukleáza. Po elektroforetické separaci je rovněž doporučováno opětovné přečištění (Green & Sambrook, 2012).
5. Ligace cizorodé DNA do plazmidu – tedy inzertu do vektoru, je zprostředkováno na základě komplementarity bází. Inzerční místo v plazmidu vektoru se nejčastěji nachází uvnitř otevřeného čtecího rámce (ORF – Open Reading Frame). Inzercí dochází k přerušení určité sekvence, která se projeví rozdílným fenotypem. U bakterií *Escherichia coli* se nejčastěji využívá barevného indikátoru, kde inzercí dochází k přerušení genu *lacZ*, odpovědného za tvorbu  $\beta$  – galaktosidázy. Tento enzym štěpí laktózu na glukózu a galaktózu a je to první krok v katabolismu laktózy. Výsledkem je, že bakterie s aktivním enzymem tvoří na agarovém médiu obsahujícím X – gal modré kolonie, zatímco buňky bez tohoto enzymu tvoří kolonie bílé. K inzerčnímu místu přiléhá, jak již bylo zmíněno v bodě dva, specifická sekvence obsahující velký počet restričních míst, které slouží pro získání rekombinačního fragmentu po jeho klonování. Samotný proces ligace je zprostředkováván DNA ligázou (Snustad & Simmons, 2009).
6. Transformace – v posledním kroku je plazmid, nesoucí rekombinantní úsek DNA, vnesen do hostitelské kolonie bakterií. Tyto bakterie jsou

kultivovány na selekčních médiích, na kterých přežijí pouze ty bakterie, které nesou transformovaný plazmid. Kolonie, které vytvářejí odpovídající fenotyp, jsou vybrány pro následnou izolaci inzertovaného úseku DNA (Alberts *et al.*, 2008).



Obrázek 1 – Obecné schéma klonování DNA, A – úsek pro selekční gen, B – inzerční místo s 1 bp přesahem, v okolí inzerčního místa se může nacházet různý počet rozpoznávacích sekvencí pro restrikční endonukleázy (upraveno Promega, 2010)

Restrikční místa restrikčních endonukleáz se vyskytují v kódujících i nekódujících sekvencích, a ve všech třech genomech, jaderném (nDNA), chloroplastovém (cpDNA) i mitochondriálním (mtDNA). Chloroplastový genom, spolu s mitochondriálním, je ve srovnání s jaderným poměrně malý. Množství DNA, získané z těchto genomů, není proto často dostačující. Pro amplifikaci velkých fragmentů se využívá metoda klonování.

### 3.5.3 Amplifikační markery

Amplifikační markery jsou založeny na dnes již rutinně využívané polymerázové řetězové reakci (PCR), kterou objevil v roce 1983 Kerry Mullis. Tato metoda umožňuje, oproti starším technikám, rychlou produkci specifických úseků DNA *in vitro*, pouze s několika málo molekulami původního templátu (Mullis *et al.*, 1986). Právě nízká koncentrace výchozí DNA je výhodou oproti DNA – DNA hybridizačním technikám. Tato rychlá amplifikace rovněž nahradila samotný proces klonování u celé řady molekulárních metod.

Principem PCR je již zmíněná *de novo* syntéza nových řetězců ve třech po sobě jdoucích krocích v několika opakováních. Prvním krokem je denaturace dsDNA, ve druhém se na oba řetězce napojují primery, které označují místa pro syntézu nových řetězců, vznikajících při posledním kroku – elongaci. Primery jsou krátké

oligonukleotidové sekvence, dlouhé 6 – 32 bp, komplementární ke koncům studovaných lokusů (Semagn *et al.*, 2006).

Techniky založené na PCR mohou být rozděleny pomocí primerů na dvě základní kategorie. První se zabývá úseky DNA bez předchozí znalosti jejich sekvence, využívá tedy náhodné primery. Druhá metoda vyžaduje již přesnou znalost studovaného fragmentu, jedná se o specifické primery, komplementární k určité sekvenci DNA.

#### **3.5.4 Markery založené na amplifikaci náhodných fragmentů**

Mezi první dvě metody, které byly vynalezeny s využitím hybridizace náhodných primerů, patří RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) a AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

RAPD technika byla první PCR metoda, založená na molekulárních markerech studujících genetickou variaci. Tato metoda využívá krátkých primerů k náhodné amplifikaci různě dlouhých úseků genomické DNA. Po elektroforetické separaci a vizualizaci pod UV zářením je možné získat téměř neomezený počet DNA markerů. Výhodou této metody je, že není nutná předchozí znalost genomu. Krátké sekvence primerů umožňují náhodné nasedání v genomu, a tedy celé jeho pokrytí (White *et al.*, 2007). Nevýhodou této metody však může být její reprodukovatelnost mezi laboratořemi. Profilování DNA pomocí RAPD je striktně závislé na reakčních podmínkách PCR. Rovněž není možné odlišit heterozygotní a homozygotní jedince. Nezávislé variace RAPD jsou: AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) a DAF (DNA Amplification Fingerprinting). AP-PCR využívá 10 – 15 bp dlouhé primery, přičemž je po prvních dvou cyklech PCR navýšena teplota jejich nasedání. Produkty DAF jsou na rozdíl od RAPD markerů separovány na polyakrylamidovém gelu a barveny stříbrem, čímž je možné rozlišit polymorfizmy v rámci 2 – 5 bp (Agarwal *et al.*, 2008).

Metoda AFLP propojuje RFLP spolu s metodou RAPD, je však více specifická a reprodukovatelná. Specifita této metody je způsobena využitím selektivních primerů při každé reakci, kdy je redukován počet vzniklých fragmentů v závislosti na počtu selektivních nukleotidů. Pomocí AFLP, stejně jako metodou RAPD, je možné mapovat genom bez jeho předchozí znalosti. AFLP metoda navíc poskytuje mnohem častěji unikátní markery, které lze využít při tvorbě genetických map (Mishra *et al.*, 2014).

Polymorfismus AFLP markerů má však oproti RAPD metodě více příčin (Arif *et al.*, 2010), které je činí více specifické. Nevýhodou je náročnost této metody a kvalita vstupní DNA.

### 3.5.5 Markery založené na amplifikaci specifických fragmentů

Při znalosti studované sekvence lze využít rozdílných přístupů k její analýze. S příchodem moderních sekvenčních technologií byla vyvinuta skupina markerů, označených jako ESTs (Expressed Sequence Tags). ESTs jsou části molekul mRNA, dlouhé nejčastěji 300 – 500 bp, které byly reverzní transkripcí přepsány do cDNA (komplementární DNA) (Ayeh, 2008). ESTs markery představují genové sekvence, které jsou specificky exprimovány pouze v určitých fázích vývoje, ve specifických buňkách a za určitých podmínek. Markery ESTs byly odvozeny především pro hospodářsky využívané plodiny jako ječmen, kukuřice, cukrová třtina, rajče a bavlna (Li *et al.*, 2014). Sekvence ESTs jsou využívány jako cenný zdroj polymorfních markerů, a při metodách, které determinují míru exprese vybraných úseků. Jak již bylo zmíněno, EST markery jsou získávány z mRNA, tudíž neobsahují intronové oblasti. Přesto byly nalezeny uvnitř studovaných genů repetitivní mikrosatelitové sekvence, které umožňují studium vzdáleně příbuzných druhů. Metoda (EST-SSRs) má však nízkou frekvenci alel na jeden lokus (Qureshi *et al.*, 2004).

Další velkou a významnou skupinou jsou markery odvozené od QTL (Quantitative Trait Loci). QTL lokusy představují úseky DNA nesoucí geny odpovědné za významné užitkové vlastnosti. Ačkoli tyto geny nejsou zdaleka všechny determinovány, jsou známy jejich specifické alelové varianty (např. výnos zrna u obilovin, rezistence k abiotickým a biotickým faktorům). QTL markery nemusí být strukturální součástí těchto genů, ale mohou být i v těsné vazbě mimo jejich struktury (Li *et al.*, 2013).

Oblíbenou skupinou molekulárních znaků jsou markery založené na variabilitě transponovatelných elementů. Transponovatelné elementy (TE) jsou úseky DNA, které ve svých sekvencích kódují aparát nutný pro jejich přemístění v rámci genomu (pro retroelementy strukturální gen *gag*, gen *prot* pro proteázu, a geny pro reverzní transkriptázu, RNázu H a integrázu). TE byly dlouho považovány za nevýznamnou část genomu organismů, ale v poslední době se ukazuje jejich nezastupitelná funkce v rámci evoluce (Federoff, 2012). Díky jejich velkému výskytu v genomu a jejich vzájemné transpozici jsou TE oblíbeným nástrojem při studiu genetické diverzity, a při molekulárních analýzách jsou často využívány v kombinaci jiných metod, jako jsou AFLP nebo SSR. Princip molekulárních markerů, které analyzují transponovatelné elementy, je založen na amplifikaci specifické oblasti (Agarwal *et al.*, 2008). Jeden primer bývá obvykle navržen tak, aby byl komplementární k oblasti studovaného transpononu, druhý primer pak odpovídá sekvenci, která je spojená s daným TE. Mezi

nejvýznamnější metody podle Mondini *et al.* (2009), zabývající se TE, patří: IRAP (Inter-Retrotranspozon Amplified Polymorphism), SSAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism), REMAP (Retrotranspozon-Microsatelite Amplified Polymorphism), RBIP (Retrotranspozon-Based Amplified Polymorphism) a TD (Transposable Display).

S rozvojem sekvenčních databází byla objevena silně se rozvíjející skupina DNA markerů, nazývaných SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Tyto jednonukleotidové mutace, nejčastěji bíalelického původu (vznikají v důsledku tranzice nebo transverze), jsou rozmístěny v celém genomu ve velmi variabilním množství mezi jednotlivými druhy (Jiang, 2013). Jsou proto velmi vhodné při konstrukci rozsáhlých a podrobných genetických map. V kódujících sekvencích způsobují často změny v konečném produktu příslušné sekvence. Nejvíce těchto mutací je však lokalizováno spíše v nekódujících oblastech (Arif *et al.*, 2010). Většina metod analyzujících SNP, jak uvádí Vignal *et al.* (2002), jsou založeny na alelově-specifické hybridizaci, oligonukleotidové ligaci, alelově-specifické PCR, a na specificky konstruovaných primerech, které jsou komplementární k oblastem výskytu jednonukleotidových polymorfizmů. Vývoj a detekce nových SNP vychází často z EST, překrývajících se oblastí kontigů při konstrukci BAC knihoven (Bacterial Artificial Chromosome) a z RRS (Reduced Representation Shotgun).

I když jsou tato kapitola a tato práce zaměřeny na DNA markery, je nezbytné neopomenout dvě techniky, které se rovněž dostávají do popředí při analýzách genetické variability a fylogenetických studiích. Jedná se o Real-Time PCR, kdy je s detekcí příslušné sekvence cDNA provedena i její kvantifikace buď za použití fluorescenčních barviv, které interkalují s dsDNA, nebo za použití oligonukleotidových fluorescenčně značených sond. Druhou skupinou technik jsou pak RNA-odvozené markery cDNA-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) (Cronn & Adams, 2003), cDNA-AFLP (Ritter *et al.*, 2009), RAP-PCR (Random Amplified Polymorphism-PCR) (Kelly *et al.*, 2000) a cDNA-SSR (Suresh *et al.*, 2013).

### **3.5.6 Simple Sequence Repeat (SSR)**

Velmi oblíbeným a cenným nástrojem při studiích polymorfizmu jsou mikrosatelitní oblasti, neboli SSRs (Simple Sequence Repeats), které lze rovněž v literatuře najít pod dalšími synonymy, uvedenými v předchozí práci Bačovský (2013), spolu s charakterizací a využitím SSR markerů u rostlin.

Vývoj těchto markerů je značně náročný, přesto ale bývají hojně využívány díky jejich vysoké míře polymorfizmu a jejich rovnoměrnému zastoupení napříč celým genomem. Vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech, a ačkoli jejich hlavní úloha není přesně identifikována, hrají významnou roli při závažných poruchách a onemocněních. Velkou oblibu mají tyto markery především díky kodominantnímu charakteru, kterým lze identifikovat příslušnou alelu od obou rodičů, a zároveň díky vysoké frekvenci alel na jeden lokus. Vignal *et al.* (2002) uvádí, že v průměru čtyři variabilní mikrosatelitové oblasti, s mutační rychlostí alespoň  $10^{-5}$ , jsou dostačující pro identifikaci a studium diverzity příslušného druhu, ve srovnání např. SNPs markery, u kterých je potřebný počet lokusů mnohonásobně vyšší.

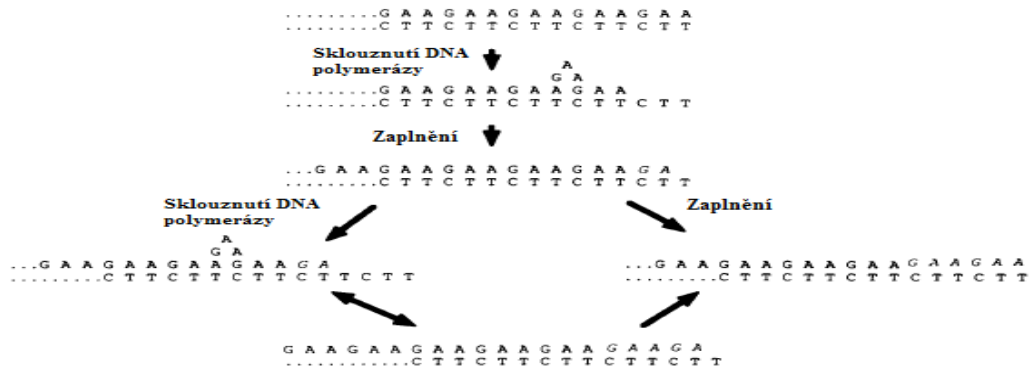
Jak již bylo zmíněno, vývoj SSR markerů je náročný proces po finanční i technické stránce. Vývoj zahrnuje konstrukci genové knihovny, detekci klonů pomocí hybridizace s mikrosatelitní sondou, následné sekvenování vybraných klonů a konečné navržení primerů pro PCR ze získaných sekvencí. Největším problémem získání přesného sledu sekvence mikrosatelitů je však právě jejich opakující se 1 – 6 bp motiv (Zheng *et al.*, 2008). Možnost, jak redukovat cenu a obtížnost vývoje nových SSR markerů, je jejich přenositelnost, jak uvádí Ondroušková (2011). Srovnáním běžných markerů bylo zjištěno, že marker jednoho druhu může být přítomen v druhu příbuzném nebo dokonce v rámci celého rodu. Tato přenositelnost je založena na základě homologie sekvencí v oblastech přilehajících právě k mikrosatelitním oblastem. Přenositelnost SSR markerů je nejvíce využívána u zemědělských plodin (Liu *et al.*, 2010).

Za variabilitu mikrosatelitových oblastí jsou odpovědné dva teoretické mutační mechanismy. Prvním mutačním mechanismem, který je z části zmiňován v minulé práci, je sklouznutí DNA polymerázy během replikace. Druhým pak nerovnoměrná rekombinace chromozomů při crossing-overu, a genová konverze (Tóth *et al.*, 2000). Rovněž pro různé typy mikrosatelitů je jejich mutační rychlost rozdílná. Dlouhé mikrosatelitové lokusy jsou méně stabilní, a spíše podléhají mutacím, zatímco kratší fragmenty mají tendenci expandovat, oproti delším. Delší repetice jsou také náchylnější mutovat kratší úseky, které jsou náchylnější zpětně mutovat dlouhé. Mutační rychlost je zároveň ovlivněna i sekvencemi v blízkosti mikrosatelitů (Lai & Sun, 2003).

Ke sklouznutí DNA polymerázy dochází v průběhu replikace na templátovém vlákně DNA (obr. 2). Během tohoto procesu může nastat začlenění stejného nukleotidu do nového vznikajícího vlákna DNA šroubovice. Pokud tato chyba není rozpoznána

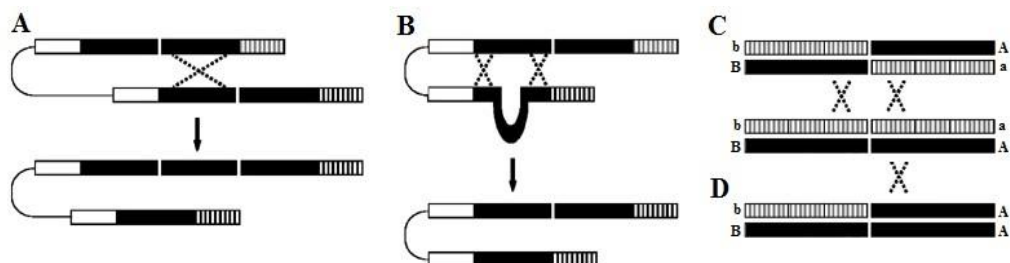


opravujícím systémem (MMR = mismatch repair), vytváří se nová alelová varianta k původnímu genu (Li *at et.*, 2004). Ke sklouznutí DNA polymerázy podobným způsobem může docházet rovněž při PCR, kde uvolněné vlákno z dsDNA po iniciační denaturaci není příliš stabilní a podléhá četným termálním fluktuacím. Vznikají tak artefakty (minoritní produkty), lišící se nejčastěji v délce 2 bp. Po elektroforetické separaci lze tyto produkty, označované *stutter bandy*, identifikovat jako slabší proužky asociované s hlavním produktem (Mishra *et al.*, 2014).



Obrázek 2 – Obecné znázornění sklouznutí DNA polymerázy během replikace u GAA/CTT mikrosatelitního motivu (upraveno Schlötterer & Tautz, 1992)

Při nerovnoměrném crossing-overu (obr. 3 – A, B) dochází k překřížení u chromozomových vláken, které nejsou přesně spárovány (sesterské chromatidy a homologní chromozomy při meióze). K tomuto jevu dochází u dlouhých, tandemově se opakujících sekvencí, kde má rekombinační mechanismus problém určit správné místo zápisu mezi dvěma vlákny. Vznikají tak dvě nová rozdílná vlákna, u kterých na jednom došlo k delecí a na druhém k inzerci. Genová konverze (obr. 3 – C) pak představuje přenos úseku DNA mezi dvěma nesesterskými chromatidami během rekombinace. Z donorového vlákna přechází část na vlákno akceptorové. Na rozdíl od crossing-overu se však tyto změny odehrávají pouze na jednom vlákně (Bzymek & Lovett, 2001; Reliene & Schiestl, 2003).



Obrázek 3 – Obecné schéma nerovnoměrného crossing overu a genové konverze, A – nerovnoměrný crossing over sesterských chromatid, B – genová konverze sesterských chromatid, C – D – rozdíl mezi crossing overem a genovou konverzí (upraveno Reliene & Schiestl, 2003)

K mikrosatelitním oblastem se váže mnoho metod, které využívají jejich vysokou mutační rychlost. Mezi nejvýznamnější dle Semagn *et al.* (2006) patří: STMSs (Sequence Tagged Microsatellite Site), SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphism), SNPs, SCARs (Sequence Characterized Amplified Region), CAPS, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) a SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism).

Všechny tyto metody jsou založené na amplifikaci specifických fragmentů, jejichž variabilita je závislá na konstrukci primeru, který bývá často komplementární k amplifikované oblasti, jako je tomu v případě SSRs, nebo je komplementární k sekvenci spojené se studovaným lokusem. Může být tedy selektivní s jedním nukleotidem v případě ISSR, kdy jsou primery navrženy pro daný motiv mikrosatelitu a jejich specifitu zajišťuje 1bp přesah.

### **3.6 Sekvenační markery**

Na základě molekulárních markerů je generována celá řada dat, které mapují různý stupeň variability na úrovni nukleových kyselin. Zdrojem této variability jsou mutace, které jsou produktem evolučních procesů. Tyto polymorfizmy na úrovni DNA, jak bylo zmíněno v dřívější práci Bačovský (2013), jsou prvotní příčinou genetické proměnlivosti, postihují od jednotlivých nukleotidů až celé úseky, a mohou být pro tyto úseky jak identické, tak mohou mít v rámci jednotlivých lokusů i individuální charakter. V průběhu vývoje zanechávají molekulární stopu, kterou lze využít pro analýzu evolučních vztahů, determinaci úrovně příbuznosti, a pro sestavování fylogenetických stromů, které zobrazují evoluci studovaných organismů.

Vývoj sekvenčních technologií umožnil rozvoj sekvenčních databází, a kromě celé řady molekulárních markerů založených na PCR, také rozvoj molekulární fylogenetiky. Obzvláště dnes, díky tzv. "next generation sequencing" metodám, lze v krátkém čase získat přesný sled nukleotidů tisíce sekvencí najednou. Dnes nejběžněji komerčně dostupnými technologiemi jsou pyrosekvenování 454 (Roche), Solexa (Illumina) a SOLiD (Applied Biosystems). Tyto nové technologie umožňují během jednoho týdne osekvenovat 0,1 – 4 gigabáze v celkové hodnotě 3 400 – 8 500 US\$ (Arif *et al.*, 2010).

Molekulární fylogenetika, jak již bylo naznačeno, studuje vztahy v rámci evolučních procesů mezi druhy, přičemž využívá molekulárně – biologická data. Tyto informace, získané ze sekvenčních analýz, mají celou řadu výhod oproti morfologickým

a fyziologickým markerům, mají např. mnohem více informativních znaků a jsou lépe převeditelné na kvantitativní hodnocení. Tyto znaky ale nemají vliv na přirozený výběr, proto jsou vhodné pro zobrazení evoluční příbuznosti druhů (Mondini *et al.*, 2009). Díky této vlastnosti lze pak rozlišit konvergentní, divergentní a paralelní evoluci. Při divergentní evoluci dochází k akumulaci rozdílů mezi dvěma druhy pocházejícími ze stejného předka a posléze vznikají druhy nové. Konvergentní evolucí vznikají naopak podobné znaky u rozdílných druhů, a to náhodným působením podobných selekčních podmínek. Při paralelní evoluci se vlivem stabilizace selekčního tlaku, který nemusí být stejný, vyvíjejí podobným způsobem dva druhy bez stejného předka (Rosenblum, 2006).

U taxonomických studií, které využívají molekulárních markerů, zejména v oboru molekulární fylogenetiky, by molekulární data měla být doplňována o data morfologická. Molekulární data poskytují užitečné informace o vlastnostech, které dávají vzniknout novým liniím (kladogeneze). Avšak bez morfologických dat, která ukazují změny vlastností v rámci nové linie (anagenezi), nelze správně určit, zda opravdu soubor jedinců v příslušném fylogramu patří do správného taxonu (Aze *et al.*, 2013).

### **3.6.1 Sekvence vhodné pro fylogenetické analýzy**

Sekvenční data DNA, která jsou nejvhodnější a nejpřímější zdroj informací pro fylogenetiku, vycházejí ze tří různých genomů – jaderného, chloroplastového a mitochondriálního. V rámci každého genomu se liší fixace a rychlost jednotlivých mutací, tzv. substituční rychlost, při které se fixuje určitý počet mutací v dané pozici DNA za stanovenou časovou jednotku (nejčastěji 1 rok). Při této rychlosti tedy vznikají rozdíly, které činí každý lokus DNA více či méně vhodný jako zdroj fylogeneticky informativních znaků.

Obecně nejvíce selekčně neutrálních mutací lze identifikovat v nekódujících a repetitivních sekvencích, a v pseudogenech. U rostlin má nejvyšší substituční rychlost genom jaderný. Genom mitochondriální je konzervativní, na rozdíl od mtDNA u živočichů, která je pro fylogenetické účely často využívána. V chloroplastovém genomu lze nalézt oblasti, které jsou jak konzervativní (obrácené repetitivní úseky), tak i variabilní (jednokopiové sekvence a geny lokalizované v cpDNA) (Hartl, 2012).

Obecně platí, že výběr vhodné sekvence záleží na její variabilitě a evoluční vzdálenosti ke studovaným druhům. Pro druhy příbuzné jsou nejčastěji zvoleny takové

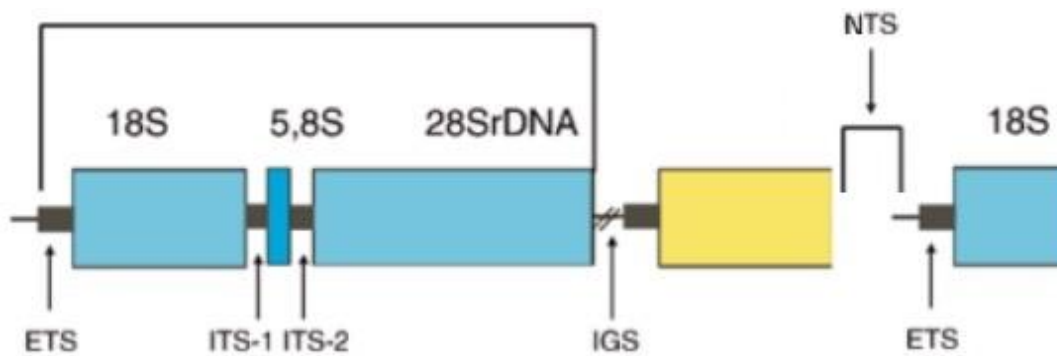
sekvence, které mají vysokou úroveň substituční rychlosti (pseudogeny). Druhy, které jsou od sebe vzdálené, jsou naopak analyzovány pomocí lokusů, které jsou více konzervativní nebo specifické pro daný druh (exony). Při studiu zvláště vzdálenějších druhů je pro analýzu evoluční příbuznosti výhodnější zvolit více na sobě nezávislých lokusů DNA, které mohou být i kratší, nežli zvolit jeden dlouhý, kódující úsek (Christelová, 2011). V moderní fylogenetice jsou nejčastěji využívány lokusy vyskytující se na chloroplastové DNA a lokusy jaderné ribozomální DNA (rDNA).

V této studii byl využit v metodické části vnitřní transkribovaný mezerník (ITS = Internal Transcribed Spacer), proto mu bude v rámci literární rešerše věnována větší pozornost.

### **3.6.2 Ribozomální jaderná DNA**

Jedna z možných oblastí genomu, které lze využít při srovnávacích studiích ve fylogenetických analýzách, je ribozomální DNA (rDNA), neboli jaderná ribozomální DNA (nrDNA). Geny organizátoru jádérka jsou uspořádány do jednotlivých klusterů, a ty jsou organizovány jako tandemové repetice, které jsou transkribovány jako jediná jednotka (He *et al.*, 2005).

Tyto jednotlivé klustery se nacházejí v každé buňce ve stovkách až tisících kopiích, které jsou organizovány jako tandemové repetice. Jednotlivé fragmenty se značí jednotkou Svedberg (S), která udává čas, při kterém proběhne sedimentace dané makromolekuly při její ultracentrifugaci v hustotním gradientu. Jedna jednotka rDNA sestává z 5S lokusu, který je lokalizován mimo podjednotku 45S. Tento komplex (obr. 4) lze rozdělit obecně na genové lokusy, transkribované jako jeden celek, 18S – 5.8S – 28S, které jsou od sebe odděleny vnějším a vnitřním transkribovaným mezerníkem. Jednotlivé jednotky 45S jsou odděleny netranskribovaným mezerníkem, který každou jednotku ukončuje. 45S obsahuje úseky v závislosti na jejich původu v rámci buňky. Záleží tedy, zda se jedná o mitochondriální, cytosolové či plastidové sekvence (Storch *et al.*, 2013). Původ jednotlivých ribozomů ovlivňuje také jejich citlivost k antibiotikům, což potvrzuje endosymbiotickou teorii migrace prokaryotních buňek do eukaryotních.



Obrázek 4 – Obecné znázornění ribozomální struktury DNA; ETS – (external transcribed spacer) vnější transkribovaný mezerník, ITS 1 a ITS 2 – (internal transcribed spacer 1, 2) vnitřní transkribovaný mezerník, IGS – (intergenic spacer) mezigenový mezerník, NTS – (nontranscribed spacer) netranskribovaný mezerník (upraveno Storch *et al.*, 2013)

V rámci vnitřní organizace ribozomální podjednotky existuje rozdíl ve variabilitě výše popsaných lokusů rDNA. Kódující oblasti jsou, stejně jako v cp genomu, konzervativní. Jejich srovnání je vhodné spíše pro vzdálenější druhy, a konce těchto oblastí umožňují navrhnutí specifických primerů, které lze využít pro amplifikaci vybraných lokusů vnějších či vnitřních transkribovaných mezerníků (White *et al.*, 1990). Právě vnitřní mezerníkové oblasti jsou nejčastěji využívaným markerem při konstrukci fylogenetických stromů. Hlavní výhodou ITS sekvencí je jejich univerzálnost. Jedná se o velmi variabilní oblasti, které jsou obklopeny konzervativní strukturou genů. Samotná délka oblasti ITS1 – 5.8S – ITS2 většinou nepřesahuje délku 750 bp (včetně primerů), což je délka, která umožňuje jednoduchou amplifikaci PCR, a přímou sekvenaci bez použití specifických vnitřních primerů (Hillis & Dixon, 1991).

Variabilita ITS sekvencí je dostatečně vysoká, aby bylo možné uplatnit tuto oblast DNA pro studium příbuzných rodů a druhů, přičemž vyšší variabilitu vykazuje oblast ITS1 oproti ITS2. Blaalid *et al.* (2013) srovnáním téměř 135 000 ITS sekvencí u hub rodu *Ascomycota* a *Basidiomycota*, objevili rozdíly na druhové úrovni porovnáním podobnosti těchto dat, získaných z databází UNITE (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database) a INSD (International Nucleotide Sequence Database).

Jedním ze znaků ribozomální DNA je schopnost tzv. „concerted evolution“ neboli koordinované evoluce. Tento sjednocený vývoj sekvencí napříč všemi kopiemi rDNA zajišťuje jejich vysokou uniformitu. Je tedy zajištěna homogenizace genů rDNA, kdy dochází k hromadění stejných mutací u všech klasterů, které se tak vyvíjejí jako celek, a nevzniká tedy sekvenční variabilita každé podjednotky 45S (LeRiche *et al.*, 2014). I přes tento ucelený vývoj rDNA může dojít k odchylce od koordinované evoluce, kdy není homogenizace kompletní, a jeden druh tak může mít více variant ITS

oblastí (Ambrose & Crease, 2011). K tomuto jevu, kdy se jednotlivé úseky rDNA vyvíjejí nezávisle na sobě, dochází hlavně u hybridních druhů, kde v důsledku hybridizace nebo polyploidizace došlo k zachování obou variant rDNA rodičů. Tyto odchylky od ucelené homogenizace lze využít při detekci a identifikaci rodičovských linií u hybridů. Neschopnost sexuální rekombinace nebo přítomnost nehomologních chromozomů pak zpomaluje proces homogenizace (Aguilar *et al.*, 1999). Aby však bylo možné identifikovat jednotlivé varianty rDNA, není vhodné využití přímého sekvenování genomické rDNA z jednoho amplikonu PCR. Využívá se tedy procesu klonování (kapitola 3.5.2), a následného sekvenování několika klonů.

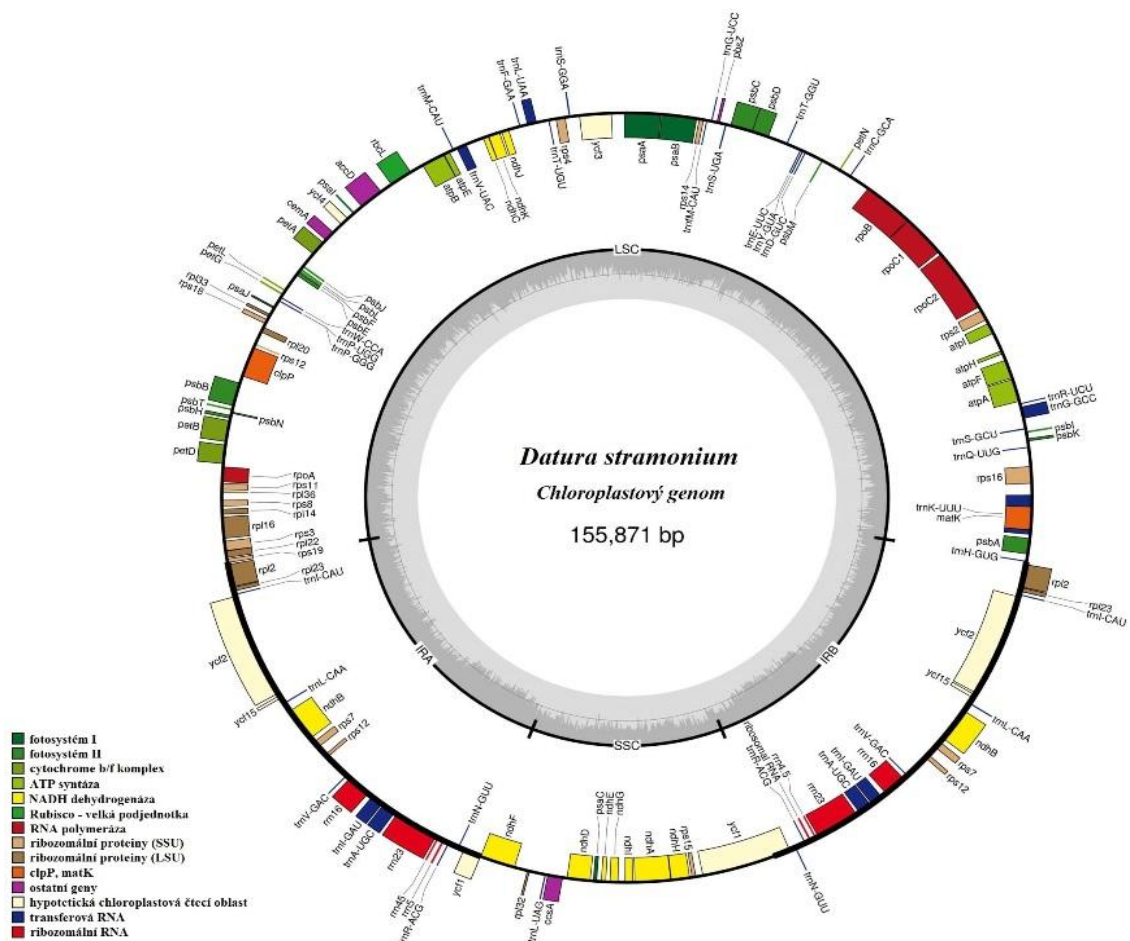
### 3.6.3 Chloroplastová DNA

Chloroplastový (cp) genom se liší v závislosti na rostlinném druhu. U vyšších rostlin dosahuje průměrné velikost 120 – 200 kb, avšak u nižších rostlin byly nalezeny i cp genomy o velikosti 37 kb. Na jednu fotosyntetizující buňku připadá zhruba 1000 – 10 000 kopií, které jsou v cirkulární struktuře, a která je pro většinu rostlin maternálně děděna (Yang *et al.*, 2014).

Struktura chloroplastového genomu se skládá ze dvou obrácených repetit (IRA, IRb), které od sebe oddělují jednu velkou a jednu malou jednotku (LSC = large single copy, SSC = short single copy; Obr. 5). Počet genů, lokalizovaných v cp genomu, je průměrně mezi 60 – 200, přičemž většina genů kóduje spíše transferovou a ribozomální RNA (Lin *et al.*, 2012).

Chloroplastový genom se těší ve fylogenetických studiích největší oblibě, zejména díky využití univerzálních primerů a dostupnosti jeho sekvencí. Chloroplastové geny jsou navíc konzervativnější, ve srovnání s geny jadernými, jsou tudíž vhodné i pro studium vzdálených druhů. Naproti tomu genové mezerníky, lokalizované v cpDNA, mají dostatečnou substituční rychlost i pro studium druhů na nižších taxonomických úrovních. Rovněž byl zjištěn i nižší počet pseudogenů, cizorodé DNA a repetitivních sekvencí. V roce 2009 byly specifické sekvence cpDNA použity pro analýzu více než 13 000 druhů, což byla doposud jedna z největších fylogenetických studií (Smith *et al.*, 2009).

Nevýhodou při studiu hybridních druhů je pro cpDNA její uniparentální dědičnost, kdy je lepší k identifikaci rodičů využít zmíněné jaderné DNA, zejména genů ribozomální DNA a intergenových transkribovaných mezerníků.



Obrázek 5 – Chloroplastová mapa genomu durmanu obecného; IRA/IRb – obrácené repetice (inverted repeats), LSC – dlouhá jednokopiová oblast (long single copy), SSC – krátká jednokopiová oblast (short single copy; upraveno Yang et al., 2014)

### 3.6.4 Ostatní sekvence využívané pro fylogenetické studie

Mezi sekvence, které se dnes využívají k fylogenetickým studiím, patří i jaderné geny s nízkým počtem opakování. Tyto geny zahrnují oblasti s vysokou proměnlivostí (intronové oblasti), zároveň však i geny, které jsou konzervativní, a téměř se neliší. Takovým příkladem je např. gen *Pax6* u myši a jeho podobnost s genem *eyeless* u *Drosophily melanogaster* L. (Janq et al., 2003). Studium jaderných genů odpadá problém parentální či maternální dědičnosti, zároveň jejich nízký počet nabízí možnosti studia jednotlivých genů a jejich nezávislost na sobě.

Hlavní nevýhodou studia jaderných genů je potřeba homogenity vstupních dat pro rozlišení paralogních a ortologních genů, tedy podobnost studovaných sekvencí v závislosti na jejich společném původu, a následnou komparaci. Paralogní i ortologní geny mají sice společného předka, ale geny ortologní vznikly speciací, zatímco geny paralogní v důsledku duplikace ancestrálního genu. Oba typy genů odrážejí tedy rozdílný průběh evoluce (Wu et al., 2014).

### 3.7 Elektrolytické pufrý a DNA markery

Dnes existuje celá řada technik a metod, sloužící k separaci a determinaci velikosti nebo typu jednotlivých molekul. Mezi nejčastěji využívané patří soubor elektroforetických metod, souhrnně označovaných jako elektroforéza. Tyto metody využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli, založenou na základě náboje těchto látek. Elektroforetické metody se dále dělí dle prostředí, ve kterém se nacházejí.

Pro separaci nukleových kyselin a proteinů jsou běžně používanými metodami ve většině laboratoří agarózová a kapilární elektroforéza. Tyto dvě metody separují různé velikosti molekul, jak již bylo naznačeno, na základě záporného náboje zbytku kyseliny fosforečné, obsažené ve struktuře DNA nebo RNA, přičemž s rostoucím počtem nukleotidů roste i náboj molekuly. Poměr mezi molekulovou hmotností a nábojem je tedy konstantní (Stellwagen *et al.*, 2000a).

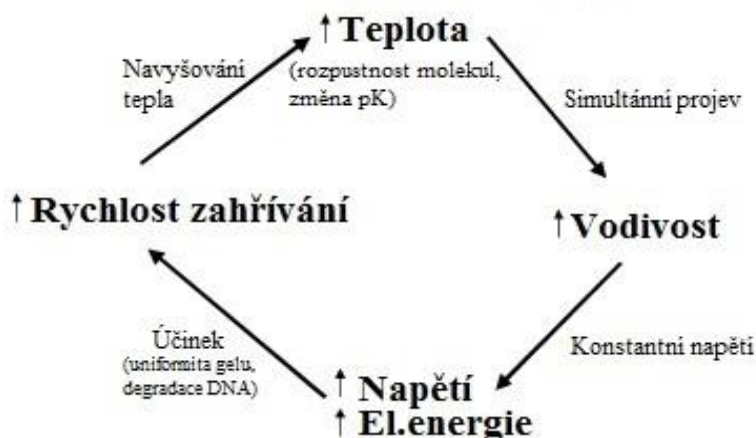
Výše zmíněná separace probíhá v přesně definovaných podmínkách. Agarózová (1,3 vázaná –  $\beta$  – D – galaktóza s 1,4 – vázanou - 3,6 – anhydro –  $\alpha$  – L – galaktózou, substituovaná ojedinele karboxylovými, pyruvátovými/sulfátovými zbytky) a polyakrylamidová média (síťované gely vytvořené reakcí akrylamidu s bifunkčním zesilujícím činidlem N, N' – methylenbisakrylamidem a dalšími složkami) jsou polymerním nebo kopolymerním komplexem molekul s póry, a stabilní prostředí zajišťují především elektrolytické pufrý. Mobilita DNA/RNA je pak především ovlivněna vlastním složením a iontovou silou elektroforetického pufru (Stellwagen, 2009).

#### 3.7.1 Vlastnosti elektrolytických pufrů

Pufr znamená tlumící, částečně neutralizovaný roztok slabých kyselin nebo zásad, které stabilizují pH a zachovávají stejné vlastnosti tohoto roztoku. Nutnost využití tlumících pufrů vyplývá ze skutečnosti, že mnohé reakce jsou velmi citlivé i na malou změnu v koncentraci volných iontů. Pufrý obecně udržují pH buď vazbou uvolněných iontů vzniklých elektrolyzou během reakce a tvorbou složitějších molekul, nebo naopak uvolňováním volných iontů, které při dané reakci bývají spotřebovány (Stellwagen *et al.*, 2000b). Tato pufrovací schopnost se nazývá pufrová kapacita, neboli odolnost pufru ke změně pH. Vztah vyjadřující poměr mezi množstvím volných kationtů nebo aniontů ( $\text{OH}^-/\text{H}_3\text{O}^+$ ) v prostředí se nazývá titrační křivka. Inflexní bod představuje místo, ve kterém konkávnost nebo konvexnost mění znaménko hodnoty z kladného na záporné a naopak. V případě nízké koncentrace volných iontů je vodivost nízká, separace DNA je



pomalá a fragmenty jsou nepřesné. Pufry o vysoké koncentraci volných iontů má velmi dobrou vodivost, ale vzniká velké množství tepla, takže může dojít k roztavení gelu nebo k denaturaci DNA. Obecně je tedy kvalita pufru ovlivněna jeho stabilitou (koncentrací volných aniontů a kationtů v roztoku), ale také vodivostí, která zpětně ovlivňuje teplotu (s rostoucí teplotou pak opět stoupá vodivost), a tím i rozpustnost jednotlivých složek v pufru (stoupá koncentrace iontů). Hodnotí se tedy pK pufru (hodnota vyjadřující kyselost a účinnost dané substance) a hodnota pH. Tento vztah



**Obrázek 6 – Obecné schéma pozitivní zpětné vazby ve slabých elektrokonduktivních médiích (upraveno Broody & Kern, 2004b)**

mezi teplotou, vodivostí a napětím se nazývá pozitivní zpětná vazba (Obr. 6) (Broody & Kern, 2004b). Další vlastnosti, rozhodující o kvalitě a vhodnosti pufru, jsou: 1) rozpustnost (ve vodě nebo rozpouštědlech); 2)

propustnost (jednoduchý transport přes buněčné membrány); 3) stabilita koncentrace iontů (stabilita sloučenin); 4) stabilita hodnoty pKa; 5) slabá afinita k těžkým kovům; 6) nereaktivnost (zejména při enzymatických procesech); 7) UV absorbance; 8) čistota (jednoduché pro výrobu bez znečištění těžkými kovy) a 9) cena (AppliChem, 2008).

### 3.7.2 Pufry využívané v současné době

Objev separačních metod DNA sahá do 40. let minulého století. Od této doby byly jednotlivé techniky postupně zdokonalovány až do prvního použití TBE (Tris, kyselina boritá, EDTA) a TAE pufrů (Tris- kyselina octová, EDTA) v letech 1968 – 1973. Ačkoli byla snaha vyvíjet nové elektrolyty a média, alternativní zdroje volných iontů, jejich vlastnosti, proces standardizace, malá dostupnost a málo informací o jejich výhodách byly vždy vyváženy i jejich vyšší cenou. Z těchto důvodů se postupně Tris pufry staly stabilně používanými jako jednotící systém při separaci nukleových kyselin (Stellwagen, 2009).

Tris, neboli trishydroxymethylaminomethan  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ , slouží vzhledem ke struktuře v pufrách jako zdroj volných iontů v jejich neutrální nebo kationtové formě ( $\text{Tris-NH}_2$ ,  $\text{Tris-NH}_3^+$ ) (Sanderson *et al.*, 2014). Oproti pufrům, obsahujícím zbytky aminů nebo borátové sloučeniny, nevytváří Tris vazby s molekulami DNA nebo RNA.

Rovněž vytváří stabilní prostředí, v rozmezí pH 7 – 9, tedy prostředí, ve kterém probíhá většina biologických procesů. Tato sloučenina se stala oblíbenou při separaci proteinů jako látka stabilizující enzymatické přeměny. Rovněž je velmi dobře propustná pro biologické membrány (Gonzales *et al.*, 1971; Weber, 1992).

Ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA s chemickým vzorcem  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$ , je konjugovaná báze a významné chelatační činidlo. Je schopná navázat dvou- a vícevazebný ligand a poskytuje centrálnímu atomu či molekule jeden nebo více elektronových párů (Chang & Ku, 2006). Díky této schopnosti se využívá v průmyslu při oddělování kovových iontů ve vodných roztocích a v humánní medicíně při odstraňování těžkých kovů z těla. V molekulární biologii se EDTA začala využívat zejména pro redukci intramolekulárních interakcí jednotlivých složek pufru, zabránění denaturaci DNA, která může být způsobena vysokou koncentrací interkalačních barviv. Tato sloučenina začala být rovněž využívána pro zpomalení endonukleázové aktivity a pro vyvázání volných hořčnatých kationtů (Broody & Kern, 2004a). Dnes však většina elučních pufrů obsahuje jak Tris tak i molekulu EDTA, a malé množství je tak přítomné již v samotném vzorku po úspěšné izolaci. EDTA je zároveň v běžně se vyskytujících pufrách zdrojem neutrálních nebo anionových forem ( $\text{COOH}$ ,  $\text{COO}^-$ ) slabých kyselin, zejména pokud obsahuje místo hydroxylových skupin atomy sodíku. S větším počtem sodíkových atomů se tedy zvyšuje i poměr vodivosti, napětí a teploty.

Mezi TBE a TAE pufrů existuje významný rozdíl, díky kterému se staly vyhledávanými ke konkrétním účelům. Kyselina octová, obsažená v TAE pufru, je bohatým zdrojem nabitých octanových aniontů, které nevytvářejí komplexy s DNA a zprostředkovávají rychlejší separaci velkých fragmentů. TBE pufr je využíván pro separaci malých úseků DNA, se kterými kyselina boritá při vysoké koncentraci může tvořit komplex borát – DNA. Tento komplex je separován mnohem pomaleji (D'Acunto *et al.*, 2002).

### **3.7.3 Využití alternativních pufrů při elektroforéze**

Vodivost, jako fyzikální veličina a převrácená hodnota elektrického odporu, je ovlivněna nejen elektrickým proudem, protékajícím vodičem, a napětím na jeho koncích, ale i vzdáleností, kterou musí elektrický proud překonat. Vodivost pufru je dána jeho složením a tzv. molární vodivostí. Molární vodivost je závislá na pH a zředění roztoku, tedy koncentraci rozpuštěných látek a volných iontů. Pohyblivost každé molekuly je zároveň ovlivněna jejím solvatačním obalem. Pokud je tento obal u

jedné molekuly širší, dochází u druhé molekuly k poklesu jejího náboje a ke snížení mobility v případě jejich střetnutí (Feynman *et al.*, 2000).

Vzhledem k obsahu jednotlivých komponent a popsaných vlastností jednotlivých molekul v předchozích kapitolách, je vysoká koncentrace nabitých molekul TBE a TAE pufrů jejich limitujícím faktorem. Vlivem pozitivní zpětné vazby dochází k lokálním termálním výkyvům, které se projeví rychlejší separací, a v důsledku jako tzv. „smile efekt“. Tento efekt často znemožňuje správnou analýzu vícealelových DNA markerů, jako jsou např. SSR, RAPD, AFLP nebo SSAP aj. Na polyakrylamidovém gelu je tento efekt navíc umocněn přítomností amoniumpersulfátových molekul.

Alternativními elektrolyty mohou být nízko – molární pufrы nebo pufrы neobsahující nadbytečné množství volných iontů. Sanderson *et al.* (2014) dosáhli přesnější vizualizace snížením koncentrace a použitím „EDTA - free“ TB (Tris, kys. boritá) a TA (tris, kys. octová) pufru. Broody & Kern (2004a) uvádějí v jejich práci SB („sodium boric acid“) pufr, který obsahuje kyselinu boritou a atomy sodíku. Tento pufr je stabilnější k lokálním výkyvům teplot a zároveň na anodálním konci (anodální pohyb kyseliny borité) vytváří stabilnější reservoár volných aniontů. Tyto anionty jsou díky pH, které je v rozmezí 8 – 8,5, v chemické rovnováze s molekulami donorové kyseliny borité. Nabitý borátový anion migruje rychlostí, která je úměrná jeho molární hmotnosti a solvatačnímu obalu. Ve srovnání s karboxylovými kyselinami je tedy mnohem pomalejší. Tato schopnost oddaluje iontové vyčerpání, kdy na anodálním a katodálním konci dochází k vyčerpání volných aniontů a kationtů, snižuje se migrace separovaných makromolekul, a zhoršuje se i jejich viditelnost na gelu. Tento efekt lze například oddálit recirkulací pufru nebo jeho chlazením či zvýšením lokální koncentrace a přidáním nového elektrolytu. Iontové vyčerpání je také určující faktor při recyklaci již použitých pufrů.

Použití elektrostabilnějších pufrů umožňuje rychlejší a kvalitnější separaci nukleových kyselin, protože nedochází k přehřívání gelu a porušení jeho integrity. Broody & Kern (2004b) také uvádějí zavedení SB pufru při zhotovování agarózových a polyakrylamidových gelů místo klasicky využívaných TAE a TBE pufrů. Ty jsou totiž v médiu zdrojem přebytečných iontů, i když jen v malém množství. Systém SB pufru společně s médiem bez Tris aniontů umožňuje až trojnásobné navýšení napětí, a zároveň zlepšuje rozlišovací schopnost. Podobným systémem je pak i LB médium, ve kterém jsou místo sodíkových atomů využívány atomy lithia.

## **4 MATERIÁL A METODIKA**

Tato diplomová práce byla zhotovena ve spolupráci s Výzkumným ústavem Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i (VÚKOZ). Analýzy DNA probíhaly v laboratoři molekulární genetiky na Ústavu biologie rostlin, analýzy rezistence vybraných jedinců na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství. Oba ústavy se nachází na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně (MENDELU), a obě pracoviště jsou pro výše zmíněné účely dostatečně vybaveny.

### **4.1 Kolekce jírovců**

Jedinci analyzovaní v této práci byli vybráni na základě určitých kritérií, která byla hodnocena v měsících říjen až listopad v roce 2013 na lokalitách uvedených v tabulce 3:

- 1) Přítomnost fytofága klíněnky jírovcové
- 2) Stav listové plochy (hodnocen výskyt atypických min, nízké poškození v rámci lokality a vyskytujících se jírovců, zdravotní stav a stáří vybraných jedinců)
- 3) Lokalita a klimatické podmínky (klimatické podmínky ovlivňují vývoj larev klíněnky jírovcové a její populační růst v dané lokalitě)
- 4) Vzdálenost jednotlivých jedinců 800 – 1000 m (předejítí stejnému genetickému materiálu)
- 5) Ošetření systémovými nebo kontaktními insekticidy či přítomnost škodlivých faktorů omezující infestaci klíněnky jírovcové

Tato kritéria byla diskutována s doc. Šefrovou a doc. Šafránkovou na Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství MENDELU, a s Ing. Mertelíkem, na VÚKOZ, v.v.i., kde byl studovaný soubor rozšířen o další druhy.

### **4.2 Rostlinný materiál**

Souřadnice jednotlivých stromů byly lokalizovány pomocí GPS. Případná aplikace insekticidních přípravků nebo průmyslových hnojiv byla ověřena za rok 2013 a 2014. Žádný z uvedených jedinců nebyl ošetřen (ústní sdělení – Ing. Alexandra Koutná, Veřejná zeleň města Brna; Odbor životního prostředí Brno střed; Bc. Jana Kučeříková, Odbor živ. prostředí Lednice; Ing. Oto Bernard, správce parku Lednice; Ing. Jitka Štěpánková, Odbor životního prostředí města Olomouc; paní Květoslava Smolková, t.č. starostka obce Prusinovice; paní Dagmar Křivková, matrikářka města Březová nad Svitavou; paní Eva Kozáková, obecní rada obce Brněnec; pan Lubomír Kopecký, obec Vítějeves; Ing. Josef Mertelík, vedoucí odboru fytoenergetiky a biodiverzity VÚKOZ, v.v.i.).

Výběr druhů a jejich identifikace byla konzultována s Ing. Mertlíkem, a na Ústavu lesnické botaniky, dendrologie a geobiocenologie Lesnické a dřevařské fakulty MENDELU.

Pro lepší izolaci DNA byl rostlinný materiál (Tab. 3a/b) odebrán v měsících březem – dubem roku 2014. Pro jednotný odběr vzorků byly z každého stromu odebrány čtyři letorosty o délce 40 – 50 cm, s nejméně čtyřmi pupeny. Tyto letorosty byly vloženy do klíčících nádob s destilovanou vodou a ponechány při pokojové teplotě. Po otevření pupenů byly získány mladé listy a velké množství trichomů na každém listu bylo mechanicky odstraněno pomocí skalpelu. Od každého stromu bylo odebráno 5 x 0,80 g do 1,50 ml mikrozkuřavky.

Vzorky, odebrané v měsíci červnu (A 1 – 10) a srpnu (A 27 – 31), byly vzhledem k pokročilému vegetačnímu období již infestované larvami klíněnky a na jejich povrchu se vyskytovala silná vrstva kutikuly. Z listů bylo proto odebíráno pouze nepoškozené pletivo bez řapíků a listové žilnatiny. Celková navážka každého vzorku byla opět 3 x 0,80 g do 1,50 ml mikrozkuřavek. Všechny odebrané vzorky byly do dalšího zpracování uloženy při  $-70^{\circ}\text{C}$  do hlubokomrazicího boxu. Tento box se nachází v laboratoři molekulární genetiky Ústavu biologie rostlin AF MENDELU v Brně. Kromě samotných vzorků byl odebrán a zamražen i listový materiál pro případné opakování.

**Tabulka 3a – Přehled rostlinného materiálu pro diplomovou práci**

Druh	Označení	Lokalita	Souřadnice	Dodatečné informace
<i>Aesculus hippocastanum</i>	A1	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Semenáč získaný ze semen rezistentního kultivaru M06 A24, atypické miny, rezistentní chování
	A2	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Semenáč získaný ze semen rezistentního kultivaru M06 A24, nižší úroveň rezistence
	A3	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Semenáč získaný ze semen rezistentního kultivaru M06 A24, nižší úroveň rezistence
	A4	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Roubovanec odvozený z A26, atypické miny, nižší poškození
	A5	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Roubovanec odvozený z A26, atypické miny, vyšší poškození
<i>Aesculus glabra</i>	AGLA	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Imunní jedinec
<i>Aesculus pavia</i>	APA	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Imunní jedinec*

**Tabulka 3b – Přehled rostlinného materiálu pro diplomovou práci (pokračování)**

Druh	Označení	Lokalita	Souřadnice	Dodatečné informace
<i>Aesculus glabra</i> <i>var. arguta</i>	AAR	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Imunní jedinec
<i>Aesculus</i> <i>carnea</i>	x ACAR R	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Imunní jedinec
	ACAR N	Brno	49°11'33.261"N, 16°34'24.726"E	Atypické miny, poškození <i>G. aesculi</i> , v aleji ojedinělý výskyt larev klíněnky jírovcové
<i>Aesculus marilandica</i>	AMA	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Imunní jedinec
<i>Aesculus parviflora</i>	APAR	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Imunní jedinec
<i>Aesculus hippocastanum</i>	A13	Prusinovice	49°22'37.100"N 17°35'9.564"E	Dobrá stav listové plochy na konci vegetačního období 2013
	A14	Brno	49°11'33.803"N 16°34'2.156"E	Dobrá stav listové plochy na konci vegetačního období 2013
	A15	Vítějeves, okr. Svitavy	49°36'39.020"N, 16°27'55.633"E	Dobrá stav listové plochy na konci vegetačního období 2013
	A16	Brněnec, okr. Svitavy	49°37'43.591"N, 16°31'14.193"E	Dobrá stav listové plochy na konci vegetačního období 2013
	A17	Březová nad Svitavou, okr. Svitavy	49°38'43.428"N, 16°31'1.103"E	Dobrá stav listové plochy na konci vegetačního období 2013
	A18	Lednice	48°47'36.071"N 16°47'52.836"E	Silné poškození larvami klíněnky j., kontrola
	A19	Lednice	48°47'46.140"N 16°48'3.899"E	Menší poškození listové plochy v rámci lokality
	A20	Olomouc	49°35'43.634"N, 17°15'42.956"E	Dobrá stav listové plochy na konci vegetačního období 2013
	A21	Brno	Dodáno MVDr. Ing. Václav Trojan, Ph.D.	Materiál odebraný z jednoho jedince, A21 nepoškozená část stromu, A22 část stromu vykazující silné stresové podmínky neznámého původu
	A22			
<i>Aesculus turbinata</i>	ATA	Brno	49°12'57.775"N, 16°36'53.206"E	Silné poškození larvami klíněnky j., BP
<i>Aesculus hippocastanum</i>	M06	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Kultivar M06, BP
	A25	Hardegg, Rakousko	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Explantátová kultura, BP
	A26	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Eventuální donorový materiál pro A4, A5, A28-31, atypické miny, rezistentní chování
	A27	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Atypické minování, rezistentní chování
	A28, A29, A30, A31	Průhonice	Pokusné plochy VÚKOZ, v.v.i.	Roubovanci odvození z A26, různá náchylnost ke klíněnce j.

Vysvětlivky: BP – bakalářská práce; A 1 – 31 – *Aesculus* 1 – 31; \* - neověřeno

### **4.3 Izolace DNA**

Rostlinná DNA byla izolována ze zmrazených pletiv a chlazená na ledu. Během izolace bylo postupováno dle DNeasy® Plant Handbook (Qiagen, 2012a), a celková DNA byla získána pomocí kitu DNeasy® Plant Mini (Qiagen).

Vzhledem k přítomnosti některých inhibičních látek a ze zkušeností, vyplývajících z dřívější práce s tímto materiálem byla snížena navážka rostlinných pletiv na 0,80 g. Tato hmotnost byla dostačující v měsících červenec/srpen 2013, kdy byla izolována DNA z listů v pokročilejším stádiu vývoje. Během této analýzy (data nejsou publikována) byla snížením navážky snížena i koncentrace sekundárních metabolitů a lipofilních látek, obsažených v kutikule a biologických membránách. Zároveň bylo navýšeno množství přidávaného P2 pufru během inkubace při 0°C z původních 130,0 µl na 300,0 µl. P2 pufr je důležitý pro správnou degradaci proteinů a rozpuštění polysacharidů, a tedy i na uvolnění DNA z jejích organizovanějších struktur. Doba inkubace zůstala však zachována. Pro lepší výtěžnost byl rovněž opakován následující krok. Celý obsah 1,50 ml mikrozkušavky byl přemístěn po lýzi buněk do speciální fialové mikrozkušavky s kolonou, která je součástí kitu, a ve které probíhá centrifugace při 18 000 otáčkách/min. Po první centrifugaci byl supernatant přemístěn do druhé mikrozkušavky, bez porušení vzniklého peletu. Tímto způsobem byla odstraněna většina nečistot, která by v dalších bodech izolace způsobovala špatnou funkčnost dalších roztoků. Vzhledem ke snížení navážky listových pletiv došlo i ke snížení celkového množství DNA, proto bylo sníženo i množství elučního pufru z 100,0 µl na 50,0 µl. Při opakování tohoto kroku byl již podle protokolu objem zachován. Poslední modifikací byla změna objemu RNázy na polovinu, tj. na 2,0 µl.

Kvalita a kvantita získané DNA byla měřena na 1,0 % agarózové elektroforéze a poměrem absorbance vlnové délky 260 nm a 280 nm na UV-spektrofotometru Picodrop (East Port). K měření DNA na agarózovém gelu bylo použito 2,50 µl nativní DNA a 2,50 µl nanášecího pufru (Qiagen). Pro Picodrop byly odebrány 2,0 µl z každého vzorku a jako slepý blank byl použit eluční pufr AE (Qiagen). Vzorky s hodnotami nejbližší 1,8 a pozitivním výsledkem na elektroforetogram byly použity v následujících analýzách.

### **4.4 Protokol PCR mikrosatelitů**

Pro každý vzorek byla připravena reakční směs do 1,50 ml mikrozkušavek. Tato směs byla následně rozdělena do 0,20 ml PCR zkušavek po 24,0 µl a doplněna na 25,0 µl templátovou DNA analyzovaných vzorků. Celý obsah byl pipetou promíchán a vzorky byly vloženy do komory termocykleru T3 (Biometra).

Díky přenositelnosti SSR markerů (kapitola 3.5.6) byly převzaty primery a profil reakce z práce Minami *et al.* (1998) i pro ostatní druhy, přičemž byly amplifikovány pouze oblasti vykazující vysokou míru variability. Teplotní a časový profil, elektroforetická separace, konečná vizualizace a hodnocení výsledků je stejné jako v předchozí práci Bačovský (2013) a Vyhnánek *et al.* (2013).

#### 4.5 Protokol PCR nrDNA

Primery pro ITS oblasti (Tab. 4) byly převzaty z práce White *et al.* (1990), kde dle protokolu na Ústavu biologie rostlin byly upraveny pro optimální amplifikaci. V rámci ribozomální jaderné DNA byla amplifikována oblast ITS1 – 5.8S – ITS2 bez využití vnitřních primerů. Příprava reakční směsi, složení reakce (Tab. 5) a teplotní profil (Tab. 6) jsou podobné jako pro mikrosatelity, pouze s jiným objemem *Taq* polymerázy, vyšším objemem dinukleotid trifosfátu a vyšším počtem cyklů. Po ukončení PCR byly vzorky uloženy při 4°C.

**Tabulka 4 – Sekvence primerů pro nrDNA (White *et al.*, 1990)**

Označení primeru	Sekvence primeru	Teplota nasedání primeru
ITS5	F:5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G - 3'	doporučená 63°C
ITS4	R:5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	doporučená 58°C

Zkratky: F – forward primer, R – reverse primer

**Tabulka 5 – Složení PCR reakce pro ITS oblasti**

Složky reakce	1 vzorek
dd H <sub>2</sub> O	16,60 µl
Pufr	5,0 µl
dNTP	0,20 µl
Primer ITS5	1,0 µl
Primer ITS4	1,0 µl
<i>Taq</i> polymeráza	0,20 µl
<b>Celkem</b>	<b>24,0 µl</b>

Zkratky: dd H<sub>2</sub>O – deionizovaná voda; dNTP – dinukleotid trifosfát; *Taq* – *Thermus aquaticus*



**Tabulka 6 – Profil PCR pro primery ITS5 a ITS4**

PCR	Teplota (°C)	Časový průběh	Počet opakování
Iničiační denaturace	94	9 min	1x
Denaturace	94	30 s	35x
Annealing (nasedání primerů)	55		
Elongace (prodlužování)	72	60 s	
Konečné prodlužování	72	7 min.	1x

#### 4.5.1 Hodnocení čistoty ITS fragmentů a purifikace

Kontrola úspěšnosti a čistoty fragmentů po PCR s ITS primery byla prováděna rovněž na 1,0% agarózovém gelu s 1xTAE pufrem (postup stejný pro SSR markery) (Bačovský, 2013). Z každého vzorku byly odebrány 2,0 µl pro zachování co největšího objemu. Velikostní marker Quick Load 100 bpDNA Ladder (Biolabs) byl pipetován v objemu 5,0 µl na začátek a konec každého gelu (koncentrace uvedená od výrobce se vztahuje pro 10,0 µl). Pomocí tohoto markeru byla zároveň odečtena i přibližná koncentrace pro sekvenování (konečná koncentrace vydělena 4). Separované fragmenty byly vizualizovány na UV transiluminátoru Ultraviolet (UltraLum Inc.) a nasnímány kamerou CCTV (Panasonic) programem Vision Capt (Analis).

Před sekvenováním byly všechny vyhodnocené fragmenty v dostačující čistotě a koncentraci purifikovány komerčně dodávaným QIAquick PCR Purification Kitem (Qiagen), kde bylo postupováno podle příslušného protokolu QIAquick Spin Handbook (Qiagen, 2012b) za použití originálních roztoků.

#### 4.6 Klonování

Po úspěšné amplifikaci a kontrole produktů bylo, u výše uvedených deseti vzorků, naneseno na 2 % agarózový gel 23,0 µl PCR produktu (2,0 µl spotřebovány na předchozí kontrolu). Izolace DNA z gelu byla prováděna pomocí komerčně dodávaného kitu Invisorb Fragment CleanUp (Stratec Molecular) a postupováno podle protokolu Invisorb® Fragment CleanUp User Manual (Stratec Molecular, 2014) s originálními roztoky. Izolovaný DNA fragment byl za dodržování bezpečnostních podmínek mechanicky vyříznut z gelu pomocí sterilního skalpelu. Každý vzorek byl následně zvážen a přenesen do 1,50 ml mikrokumavky. Rozpuštění vzorku proběhlo podle protokolu ve 30,0 µl elučního pufru.

Klonování bylo provedeno dle návodu k produktu pGEM-T Vector System (Promega, 2010), podle kterého byla spočítána i hmotnost inzertu a transformační úspěšnost pro každý vzorek:

$$x(\text{inzert}) = \frac{\text{ng hmotnost vektoru} * \text{velikost (kb)inzertu}}{\text{velikost (kb)vektoru}} * \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}} \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

$$\text{Trasnsformační úspěšnost} = \frac{\text{počet získaných kolonií}}{\text{hmotnost (ng) inzertované DNA}} \text{ [cfu/}\mu\text{g DNA]}$$



Obrázek 7 – Kultivace *E. coli* na pevném LB médiu s průměrnou transformační úspěšností  $2 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g DNA (orig. Bačovský)

#### 4.6.1 Ligace

Před ligací bylo opět provedeno odečtení přibližné koncentrace na 1% agarózovém gelu. Optimální poměr vektoru:inzertu je 3:1. Vektor pGEM-T má hmotnost 50 ng a velikost 3 kb. Velikost inzertu v tomto případě je 0,75 kb. Po dosazení do vzorce pro výpočet hmotnosti inzertu vychází hodnota 37,5 ng/ $\mu$ l. Vzhledem k průměrné koncentraci 20 – 30 ng z gelu vyřezaných fragmentů je celková dávka do ligační směsi 2  $\mu$ l (Tab. 7). Doba ligace byla 16 hodin při 14°C.

**Tabulka 7 – Složení reakční směsi ligace**

Složky reakce	1 vzorek
Ultračistá voda	6,0 $\mu$ l
10x koncentrovaný pufr pro T4 DNA ligázu	1,0 $\mu$ l
pGEM-T vektor	0,50 $\mu$ l
PCR produkt	2,0 $\mu$ l
T4 DNA ligáza	0,50 $\mu$ l
<b>Celkem</b>	<b>10,0 <math>\mu</math>l</b>

#### 4.6.2 Elektroporace a kultivace

Při elektroporaci byl použit stejný postup jako v práci Konečná (2010). Do 80,0  $\mu$ l rozmražených elektrokompetentních buněk byl přidán plazmid v objemu 5,0 – 10,0  $\mu$ l

(v závislosti na el. napětí byl objem snížen) a minutu ponechán na ledu. Vzorek byl následně přenesen do elektroporační kyvety (2 mm) a plazmid vnesen do buněk elektroporátorem (Easyjet, Equibio) při 12,5 Kv/cm, 25  $\mu$ F a 400  $\Omega$ . Ke vzorku bylo přidáno 1,0 ml SOC média (Tab. 8), a vzorek byl následně přenesen do 15 ml sterilní zkumavky s víčkem, kde byl kultivován 30 minut za stálého třepání při 37°C a 60 rpm. Takto transformované bakterie *E. coli* byly ve sterilních podmínkách jehlou vneseny do tekutého LB média a kultivovány přes víkend při 4°C. Po kultivaci byly buňky *E. coli* vysety na Petriho misky, do kterých bylo předem připraveno pevné LB médium. Pevné LB médium, stejně jako tekuté médium, bylo s agarem autoklávováno při 120°C po dobu 30 minut. Při teplotě 50 – 60°C (udržitelné v ruce) byly přidány komponenty pro selekci blue/white a ampilicin. Takto připravené médium bylo rozlito do Petriho misek a ponecháno 30 minut tuhnout. Kultivace probíhala přes noc při 37°C. Následující den bylo provedeno vzorkování. V závislosti na úspěšnosti transformace bylo vybráno 7 bílých kolonií a jedna modrá jako kontrolní vzorek. Kolonie byly odpíchnuty sterilními párátky a ponořeny v PCR zkumavkách s Tris a MgCl<sub>2</sub> roztokem.

**Tabulka 8 – Seznam použitých chemikálií při transformaci**

<b>SOC</b>	<b>Tekuté LB médium</b>	<b>Zásobní roztok X-gal</b>
20,0 g trypton	10,0 g trypton	20 mg/ml rozpuštěno v N, N – dimethyl formamid
5,0 g kvasničný extrakt	5,0 g kvasničný extrakt	<b>Zásobní roztok IPTG</b>
0,50 g NaCl	5,0 g NaCl	100 mM roztok v dH <sub>2</sub> O
0,186 g KCl	1,0 ml 1M NaOH	<b>Zásobní roztok ampilicinu</b>
5,0 ml 2M MgCl <sub>2</sub>	<b>Pevné LB médium:</b> + 15,0 g agaru	100 mg/ml ampilicinu rozpuštěno v dH <sub>2</sub> O
20,0 ml 1M glukózy		

Zkratky: dd H<sub>2</sub>O – deionizovaná voda; X-gal – 5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid; IPTG – isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid

#### 4.6.3 Testování úspěšnosti transformace pGEM-T vektorů

pGEM-T vektor nese v okolí inzerčního místa sekvence homologní k primerům T7 a SP6, pomocí kterých byla otestována úspěšnost transformace a ligace. Plazmidy z odpíchnutých *E. coli* byly izolovány kitem GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep (Fermentas, 2006) a následně otestovány PCR (Tab. 9 a 10) dle práce Konečná (2010). Po skončení PCR byly vzorky zchlazeny na 14°C.

**Tabulka 9 – Složení PCR pro testování transformace**

Složky reakce	1 vzorek
dd H <sub>2</sub> O	18,60 µl
Pufř	5,0 µl
dNTP	0,20 µl
Primer T7	0,50 µl
Primer SP6	0,50 µl
<i>Taq</i> polymeráza	0,20 µl
<b>Celkem</b>	<b>24,0 µl</b>

**Tabulka 10 – Teplotní profil PCR pro primery SP6 a T7**

PCR	Teplota (°C)	Časový průběh	Počet opakování
Iničiační denaturace	95	3 min	1 x
Denaturace	95	30 s	30 x
Annealing (nasedání primerů)	55	50 s	
Elongace (prodlužování)	72	2 min	
Konečné prodlužování	72	10 min.	1 x

#### 4.7 Sekvenování

Produkty PCR byly sekvenovány firmou Macrogen Korea. Všechny vzorky, kromě 10, byly osekvenovány bez klonování, ihned po purifikaci. U vzorků A1, A6, A8, A9, A10, A11, A19, A22, A27 a A31, u kterých nebyl zcela jasný původ fragmentů v oblasti 700 bp, a zároveň byla u některých amplikonů i slabá koncentrace, bylo využito procesu klonování. Získané sekvence byly ohodnoceny softwary ClustalX (SFI) a BioEdit (Bioedit). Sekvence reverse complement byly převedeny na webových stránkách [www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) a porovnány s genovou databází NBCI (National Center for Biotechnology Information) [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

#### 4.8 Testování SB pufru a jeho složení

Schopnost a účinnost separace SB pufru (Tab. 11) byla porovnávána s TBE pufrém na polyakrylamidovém gelu se standardní metodikou pomocí SSR markerů. Pro srovnání bylo vybráno 11 vzorků s rozdílnou velikostí fragmentů, za použití variabilní primerové kombinace AT6D8 (Minami *et al.* 1998), použité i pro molekulární analýzu v této práci.

Při přípravě SB pufru bylo postupováno podle práce Broody & Kern (2004b). Připravený 10 mM roztok hydroxidu draselného o celkovém objemu 500,0 ml byl upraven kyselinou boritou na pH 8,5. Množství hydroxidu draselného bylo vypočítáno pomocí vztahu látkového množství  $n = m/M$ , kde po dosazení do vzorce na 1x koncentrovaný roztok vychází hodnota 0,39998 g (zaokrouhлено na 0,40 g). Celkové množství kyseliny borité pro konečnou úpravu pH bylo 6,8665 g (zaokrouhлено na 6,90 g). Pro přípravu 10 x koncentrovaného roztoku byly 2,0 g NaOH rozpuštěny ve 500,0 ml deionizované vody a následně bylo přidáno 34,50 g kyseliny borité, která byla rozpuštěna za mírného zahřívání.

**Tabulka 11 – Složení médií TBE a SB pufru**

Složky	TBE médium	SB médium
Destilovaná H <sub>2</sub> O	34,650 ml	34,650 ml
TBE (10x koncentrované)	5,0 ml	x
SB (10x koncentrované)	x	5,0 ml
AKRYL/BIS	10,0 ml	10,0 ml
TEMED	334,0 µl	334,0 µl
APS (10%)	334,0 µl	334,0 µl

Zkratky: TBE – trisbáze (=trishydroxymethyl-diaminomethan; Biotech), kys.boritá, EDTA – disodium ethylendiaminotetraoctová kys. (Biotech); AKRYL/BIS – akrylamid/bisakrylamid; TEMED – tetramethylendiamin (Biotech); APS – amonium persulfát (Biotech)

#### 4.9 Hodnocení rezistence

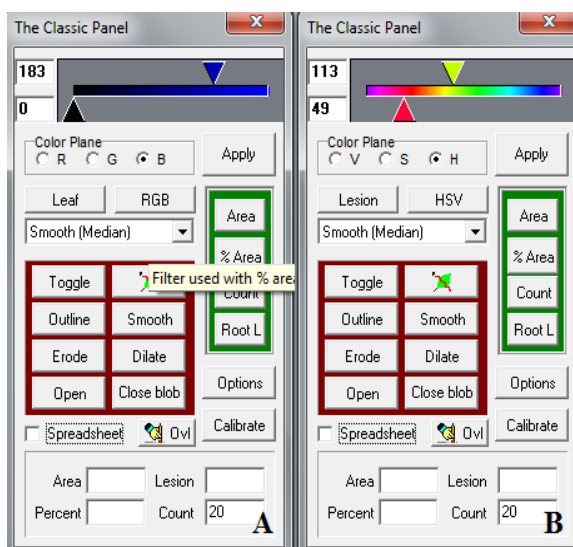
Hodnocení stavu listové plochy bylo provedeno jako doplňující ukazatel molekulárních markerů pouze u některých jedinců (Tab. 12). Hodnocení nebylo prováděno u donorového jedince A21 a A22 (stejný genetický materiál), který byl do této práce zařazen až později, a A25, kde listy nebyly hodnoceny z důvodu náročnosti a vzdálenosti. Jedinec A27 byl hodnocen pouze jednorázově na konci vegetace. Pro ostatní jedince byla listová plocha a její poškození hodnoceny od začátku do konce vegetačního období v roce 2014 nebo do doby úplného zničení listových pletiv (100 % poškození). Každý 1. a 15. den v měsíci byl pořízen digitální záznam. Vzhledem ke znalostem získaným v předchozí práci Bačovský (2013), byly fotografovány pouze listy ze spodních pater (infestace listů larvami klíněnky jírovcové přezimujících generací v opadaném listí).

Na průběh infestace v přirozených podmínkách má bezesporu velký vliv vývoj klimatických podmínek za minulý i současný rok. Avšak vzhledem k rozdílným lokalitám, ze kterých genetický materiál pochází, nebyly teplota, úhrn srážek během

vegetace, ani teplotní profil v průběhu zimního období mapovány. Vzhledem k zaměření této práce je průměrná teplota diskutována pouze okrajově. Hodnoty byly porovnány na [www.chmi.cz](http://www.chmi.cz), kde pro uvedené souřadnice v kapitole 5.2 byly na portálu Českého hydrometeorologického ústavu vyhledány stanice nejbližší lokalitám výskytu jírovců – Olomouc, Holešov, Brno – Tuřany, Svratouch.

Pro testování rezistence v umělých podmínkách je využíván systém umělé infestace, kde se jako zdroj kukel používá listí s přezimujícími kuklami. Hlavním cílem v tomto případě je hodnocení průběhu rezistence u testovaných jedinců (Ing. Mertelík, ústní sdělení).

Procentuální poškození bylo vypočítáno programem Assess verze 2.0 (ASP) a postupováno dle manuálu Assess 2.0 Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASP, 2008). Tento program je specializovaný software pro hodnocení stupně napadení rostlin patogeny na základě digitalizace obrazu a zpracování vzniklého souboru dat v počítači. Digitální záznam byl pořízen v rozlišení 4 608 x 3072 pixelů s horizontálním a vertikálním rozlišením 96 dpi a 300 dpi v závislosti na používaném fotoaparátu. Obě dvě rozlišení jsou dostačující pro kvantifikaci poškození. Samotné hodnocení bylo provedeno v panelu Classic s nastavením barevného spektra, které nejvíce vyhovovalo barevnému spektru minování larev klíněnky jírovcové (Obr. 8). Získané výsledky byly zpracovány v MicrosoftExcel 2007.



Obrázek 8 – Nastavení barevného spektra při hodnocení listové plochy (A – barevné spektrum pro označení celého listu, B – barevné spektrum pro minování)

**Tabulka 12 – Přehled hodnocení rezistence u vybraných jedinců**

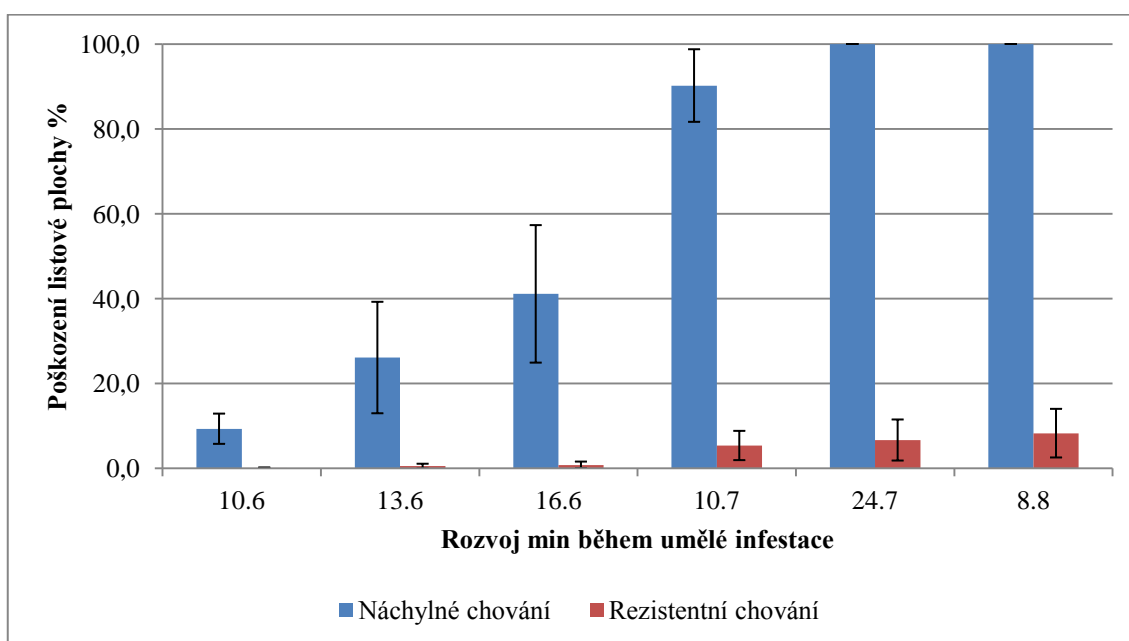
Označení	Výskyt klíněnky	Hodnocení rezistence	Označení	Výskyt klíněnky	Hodnocení rezistence
A1	Ano	Kontrolovaná infestace	A17	Ano	Přirozené podmínky
A2	Ano	Kontrolovaná infestace	A18	Ano	Přirozené podmínky
A3	Ano	Kontrolovaná infestace	A19	Ano	Přirozené podmínky
A4	Ano	Kontrolovaná infestace	A20	Ano	Přirozené podmínky
A5	Ano	Kontrolovaná infestace	A21	Nepotvrzeno	x
AGLA	Ne	x	A22	Nepotvrzeno	x
APAV	Ne*	x	ATA	Ano	Přirozené podmínky
AAR	Ne	x	M06	Ano	Kontrolovaná infestace
ACAR R	Ne	x	A25	Nepotvrzeno	x
ACAR N	Ano	Přirozené podmínky	A26	Ano	Kontrolovaná infestace
AMA	Ne	x	A27	Ano	Přirozené podmínky**
APAR	Ne	x	A28	Ano	Kontrolovaná infestace
A13	Ano	Přirozené podmínky	A29	Ano	Kontrolovaná infestace
A14	Ano	Přirozené podmínky	A30	Ano	Kontrolovaná infestace
A15	Ano	Přirozené podmínky	A31	Ano	Kontrolovaná infestace
A16	Ano	Přirozené podmínky			

Význam zkratk: x – nehodnoceno; \* – neúplný vývoj larev klíněnky jírovcové; \*\* – hodnocení provedeno pouze na konci vegetace

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Poškození jírovců v podmínkách umělé infestace

Poškození testovaných jírovců v podmínkách umělé infestace probíhala v závislosti na jejich původu, bylo tedy rozdílné u jedinců získaných ze semen a pro roubovance na různých typech podnoží. Průběh samotné infestace byl ovlivněn z největší části schopností testovaných jírovců zastavit vývoj larev klíněnky jírovcové. Z tohoto důvodu bylo hodnocení stavu listového aparátu prováděno pouze u dvou jedinců, kteří dokumentovali vývoj minování u celého souboru jedinců. Tento soubor lze rozdělit na jedince s náchylným a rezistentním chováním, které bylo v rámci dané skupiny podobné (Graf 1).



Graf 1 – Poškození listů larvami klíněnky jírovcové v podmínkách umělé infestace

Náchylné chování vykazovali jedinci A2, A3, A30 (semenáče) a roubovanci A5, A28, A29, A31. Rezistentní chování vykazovali jedinci A1 (semenáč), A4 (roubovanec), M06, který je donorový materiál pro uvedené semenáče a A26, který je donor pro uvedené roubovance. Z uvedených hodnot vyplývá, že u náchylných jedinců došlo k téměř úplnému poškození již po 30 dnech infestace, ve srovnání s rezistentními jedinci, u kterých je poškození až 17x menší (v průměru měření nepřesahovalo 5%). Umělá infestace byla prováděna v optimálních podmínkách pro vývoj klíněnky jírovcové, nebude zde tedy uváděn vliv klimatu.

### 5.2 Poškození jírovců v přirozených podmínkách

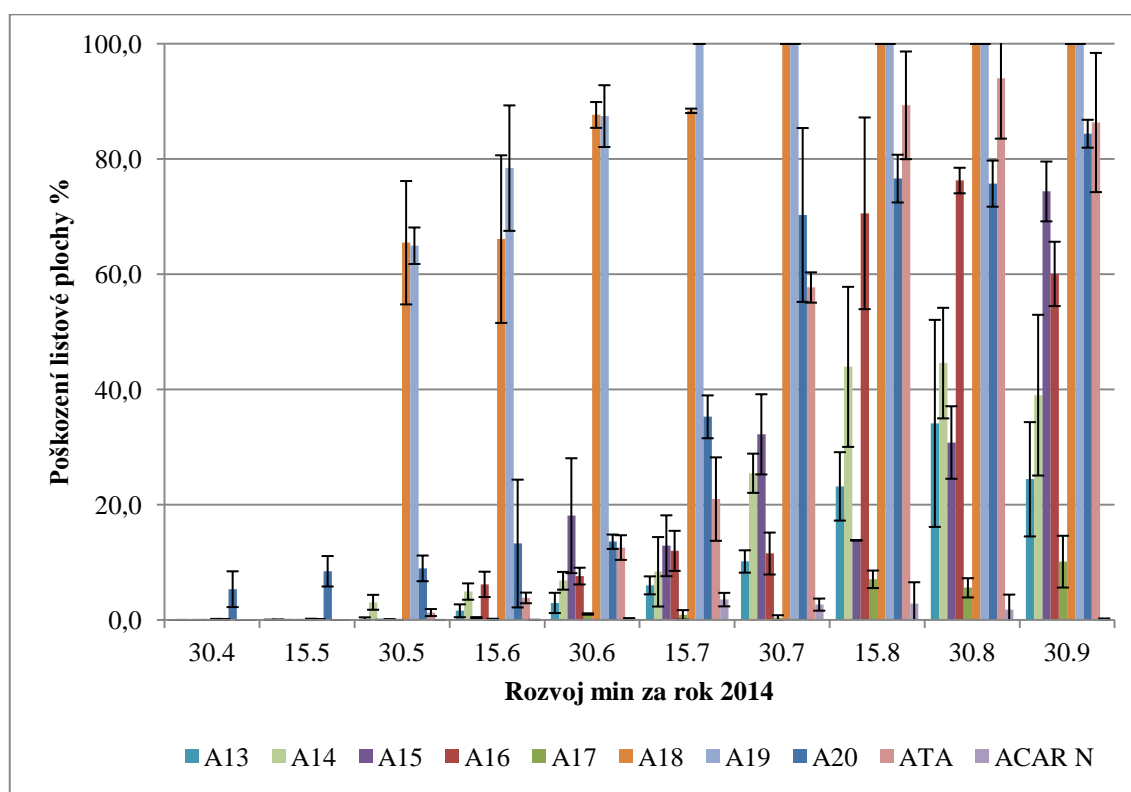
Hodnocením poškození listových pletiv v přirozených podmínkách byl zjištěn rozdílný průběh infestace v rámci každé lokality (Graf 2). Z uvedeného hodnocení byla



stanovena stupnice (Tab. 13) vyjadřující rozsah infestace a ilustrující její průběh (Obr. 9a/b). U jedinců vyskytujících se v Lednici, A18 a A19, byla listová plocha poškozená téměř ze 70 – 80 % již od konce května a od 2. poloviny července došlo k téměř kompletní defoliaci a zakládání malého počtu sekundárních listů, které ke konci vegetace byly rovněž zcela poškozeny larvami klíněnky jírovcové (data nejsou zahrnuta do hodnocení). Pro jedince A16 a A20 lze pozorovat postupný nárůst poškození listů, kde byl masivní rozvoj housenek opožděn oproti jedincům A18 a A19 téměř o dva měsíce. Avšak ke konci vegetačního období bylo rovněž možné pozorovat velké poškození listového aparátu, i když část listů byla stále schopná fotosyntetické asimilace. Tento rozdíl lze vysvětlit částečným nebo úplným zničením opadaných listů v minulém roce, které u jírovců A18 a A19 zůstává na dané lokalitě, zatímco u jedince A20 je zcela odpraveno a kompostováno, nebo v případě A16 vyplaveno říčním tokem Svitava. Úklid opadaného listí probíhá rovněž u jedinců A13, A14 a A17, kde je zajímavostí stav jejich listového aparátu v průběhu hodnocení. Jírovec A13 se vyskytuje v lokalitě, kde listová plocha nebyla příliš poškozena i u ostatních jírovců, avšak z dané lokality vykazuje za dvě vegetační období podobný průběh infestace, když na konci měření dosahovalo poškození pouhých 30%. Jedinec A14 se vyskytuje v lokalitě, kde stejně jako u jedinců A18 a A19 docházelo u některých stromů na daném místě k úplné defoliaci. Ačkoli je tento jírovec náchylný (poškození listové plochy 15.8. necelých 44 %), k dalšímu výraznému rozvoji min u tohoto jedince již nedošlo. Průběh infestace byl obdobný i v roce 2013 (stupeň poškození 7), kdy však nebyla prováděna fotodokumentace a hodnocení programem Assess. Z celého souboru analyzovaných jírovců vykazuje nejmenší poškození jedinec A17. Poškození nepřesáhlo kromě posledního hodnocení 10%, ačkoli jedinec A16, vyskytující se v obci Brněnec (spadající do stejné oblasti), dosahuje od 15.8. poškození až 70%, které se do konce vegetace již více nezvyšuje. Časový nebo teplotní únik klíněnky jírovcové může být tedy vyloučen. Po dvě vegetační období se pohybuje úroveň infestace na konci vegetace v rozmezí 10 – 15% (stupeň poškození 4). Zajímavým výsledkem je i úroveň minování u jedince A15, kde k masivnímu poškození dochází až v průběhu měsíce srpna. Tento jedinec se vyskytuje v přímé blízkosti druhého jírovce (nebyl analyzován), kde u obou dochází k silné infestaci, avšak u tohoto jedince bývá opožděna, přičemž opad listů zůstává neodstraněn (stupeň poškození za 2013 více než 50%). U jírovce japonského (ATA) dochází k poškození listového aparátu každým rokem, i když zřejmě oproti průběhu infestace u jírovce maďalu je počátek minování opožděn. Tento průběh ukazuje

srovnání s jedincem A14, u kterého je poškození menší, ale minování larev klíněnky jírovcové bylo detekovatelné již od konce května (30.5.).

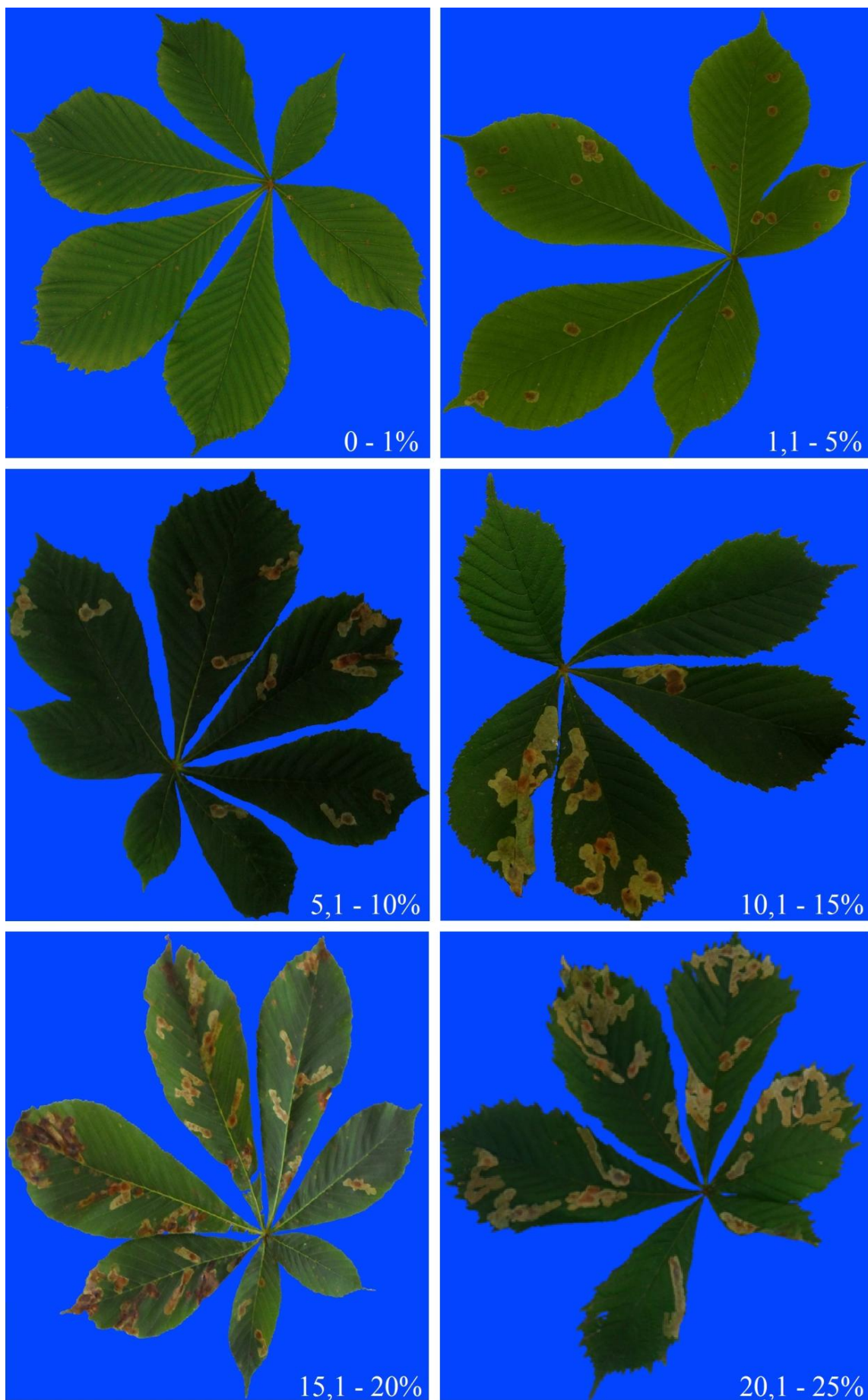
*A. x carnea* (ACAR N), vyznačující se výskytem klíněnky, byl hodnocen pro doložení náchylnosti, ve srovnání s rezistentním jedincem, který byl rovněž analyzován v rámci genetických analýz. Ačkoli miny a larvy klíněnky na tomto náchylném jedinci objeveny byly, poškození listové plochy nepřesáhlo během celé vegetace 5%. V září však nebyly detekovány žádné miny z důvodu silného výskytu houbových patogenů na stanovišti u ostatních jírovců v rámci lokality. Na začátku října došlo již k úplné defoliaci.



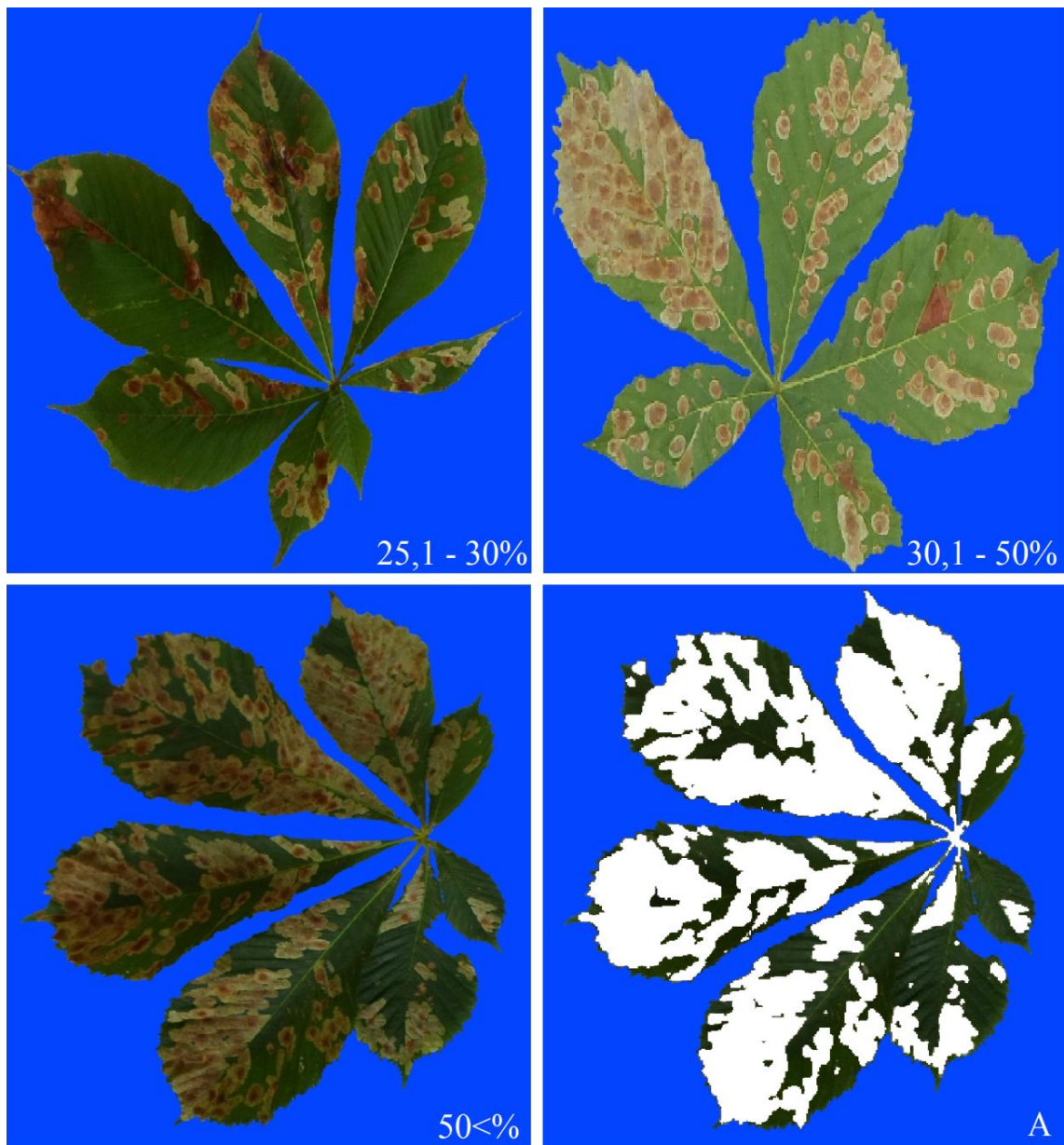
Graf 2 – Poškození listů larvami klíněnky jírovcové ve vegetačním období 2014; A13 – A20 – jedinci *A. hippocastanum*; ATA – *A. turbinata*; ACAR N – náchylný *A. x carnea*

Tabulka 13 – Stupnice poškození jírovců larvami k. jírovcové

Úroveň poškození	Poškození v %
1	0 – 1
2	1,1 – 5
3	5,1 – 10
4	10,1 – 15
5	15,1 – 20
6	20,1 – 25
7	25 – 30
8	30 – 50
9	50<



Obrázek 9a – Stupňovité poškození listů jírovců (orig. V. Bačovský)



Obrázek 9b – Stupňovité poškození listů jírovců (pokračování); A – Ohodnocení listové plochy v programu Assess 2.0 (orig. V. Bačovský)

V přirozených podmínkách byl hodnocen i genotyp jírovce maďalu A27 (Obr. 10), který vykazuje stabilní chování během posledních tří let (Ing. Mertelík, ústní sdělení). Na konci vegetačního období za minulý rok bylo zjištěno jeho průměrné poškození pouhých 35,22%, které spadá do 8. stupně poškození. Na listech tohoto genotypu bylo pozorováno i atypické minování larev klíněnky jírovcové. Míny jsou malé a mají nepravidelný tvar oproti běžným minám na obrázku 8.

Průměrné teploty pro jedince A13, A14, A18, A19, A20, ATA a ACAR N se na daných lokalitách v uvedených termínech téměř nelišily. Teplotní maxima nastávala v měsících červenec a srpen (průměrná teplota 20 – 25°C). Tento průběh teplot může





**Obrázek 10 – Atypické minování na listech genotypu *A. hippocastanum* A27; červeně vyznačeny nepravidelné miny**

vysvětlovat pozdější rozvoj larev u těchto jedinců. Stejný vývoj teplot se vyskytoval i na lokalitě jírovců A15, A16 a A17, kde však průměrná teplota byla ve srovnání s ostatními lokalitami v této práci o 4 – 5 °C nižší. Stejně jako u ostatních jedinců docházelo k největšímu poškození listových pletiv v červenci a srpnu, kdy průměrné teploty dosahovaly nejvyšších hodnot (15 – 20°C).

Průměrný úhrn srážek na všech lokalitách byl během vegetačního období 2014 velmi proměnlivý. Některá maxima (až 200 mm srážek) byla naměřena v měsících, kdy docházelo k nejsilnějšímu rozvoji larev klíněnky, jako tomu bylo např. na lokalitě jedinců A15, A16 a A17. Na ostatních lokalitách bylo průměrné množství srážek v době nárůstu poškození mezi 80 – 100 mm. Z těchto výsledků lze usoudit, že úhrn srážek v uvedených měsících neměl na míru poškození větší vliv, ačkoli v případě podrobnějších analýz by bylo nutné ověřit mortalitu a viabilitu minujících larev.

V rámci hodnocení poškození listové plochy byly rovněž zaznamenány velké rozdíly mezi jednotlivými termíny. Tyto rozdíly byly způsobené vysokým počtem min (data nejsou uvedena), které během aktuálního měření dosahovaly maximální velikosti jeden mm. Tento vysoký počet min se projevuje jako „zdánlivě okamžitá“ infestace během dalšího měření, jako je tomu v případě jedinců A16, A18, A19, A20 a ATA.

### 5.3 Vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů

Vyhodnocením jednotlivých SSR markerů nebylo zjištěno uniformní spektrum amplikonů pro žádný z uvedených mikrosatelitů (Tab. 14) jako v dřívější práci Bačovský (2013). Genetickými analýzami byla zjištěna v rámci celého souboru vysoká míra heterozygotní konstituce, která u 38,7% jedinců dosahovala 50% a více (Tab. 15). Nejvyšší byla zjištěna u *A. pavia* a genotypů jírovce maďalu A16 a A17, nejmenší pro genotyp A30, který se navíc neshoduje s profilem jeho donorového jedince A26 hned ve třech analyzovaných lokusech AT6D2, AT3D6 a AT7D1. Pro roubovance A4, A5, A8, A29 a A31 však existuje již prokazatelná shoda s profilem rostliny označené jako donor. Profil semenáčů, získaných ze semen M06, se lišil v lokusech AT6D2 pro genotypy A1 a A2, v lokuse AT5D2 pro genotypy A1 a A3, v lokuse AT6D12 se již odlišoval pouze genotyp A1 a v lokuse AT5D10 genotyp A3. U SSR markerů AT7D8 byly detekovány dvě zóny amplikonů v oblasti 80 – 120 bp a druhá, v oblasti 140 bp.

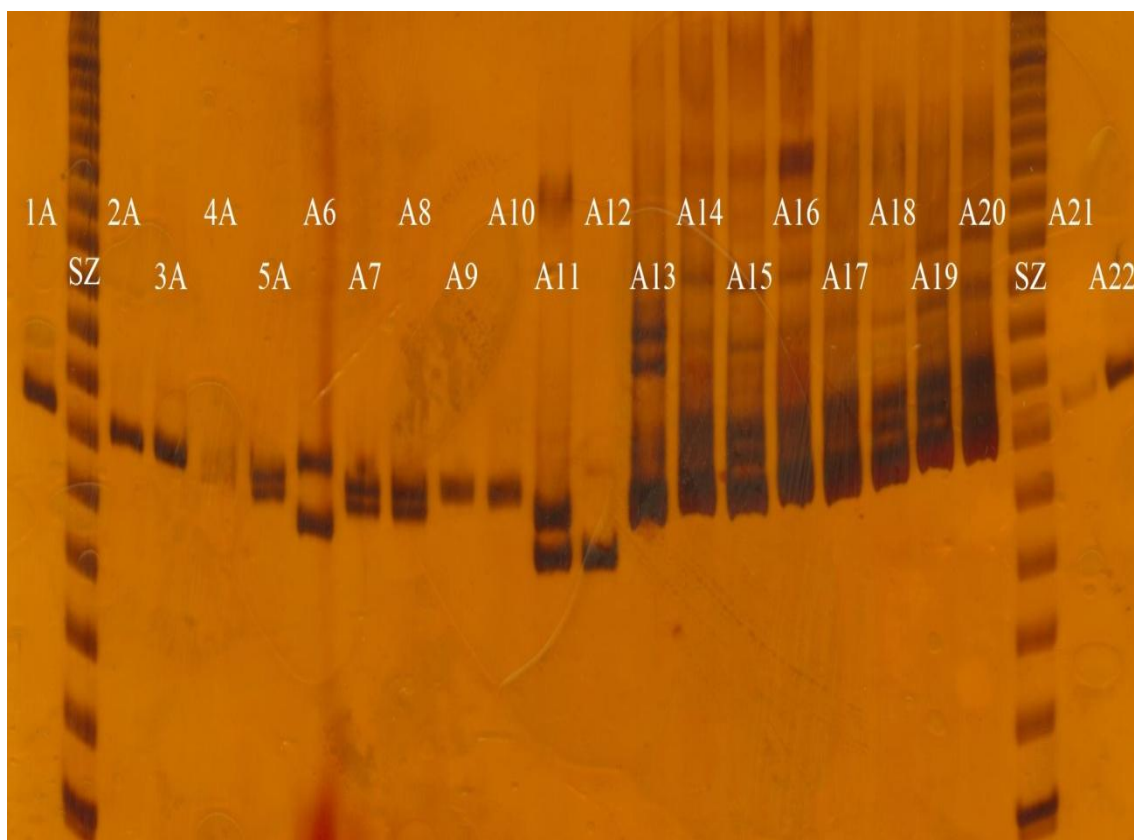
**Tabulka 14 – Vyhodnocení jednotlivých SSR markerů společně s výčtem heterozygotů na každý lokus**

SSR marker	Velikost (bp)	Počet alel	Počet alel celkem	DI	PI	PIC	Heterozygotní konstituce
<i>AT6D2</i>	260-320	6	47	0,79	0,05	0,77	A2, A3, AMA, APAR, A13, A14, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A22, M06, A25
<i>AT3D6</i>	260-320	4	41	0,50	0,30	0,45	A4, A5, AGLA, APAV, AAR, AMA, A26, A28, A29, A31
<i>AT5D2</i>	240-280	5	50	0,64	0,17	0,59	A1, A2, A3, AGLA, APAV, AAR, ACAR R, ACAR N, AMA, APAR, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21, A22
<i>AT5D10</i>	220-280	6	41	0,59	0,15	0,59	A3, APAV, ACAR R, ACAR N, AMA, A13, A15, A16, A17, ATA
<i>AT7D1</i>	180-220	5	39	0,58	0,12	0,58	APAV, ACAR R, ACAR N, A15, A16, A17, A18, A20, ATA, A27
<i>AT6D12</i>	120-180	6	47	0,67	0,14	0,63	A1, A3, APAV, A13, A15, A16, A17, ATA, A26, A27, A28, A29, A30, A31
<i>AT6D8</i>	120-160	6	35	0,47	0,28	0,46	A7, A8, A11, ATA
<i>AT7D8</i>	80-130,140	6	47	0,74	0,04	0,73	A1, A2, A3, AGLA, APAV, AAR, ACAR N, AMA, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A20, ATA, M06, A25
<b>Průměr</b>		<b>5,5</b>	<b>43,38</b>	<b>0,62</b>	<b>0,15</b>	<b>0,60</b>	

Zkratky: DI – diverzity index, PI – pravděpodobnost identity, PIC – polymorfní informační obsah

**Tabulka 15 – Heterozygotní konstituce u analyzovaných jedinců**

Jírovec	Heterozygotní konstituce (%)	Jírovec	Heterozygotní konstituce (%)
A1	37,5	A17	75,0
A2	37,5	A18	37,5
A3	62,5	A19	25,0
A4	12,5	A20	50,0
A5	12,5	A21	25,0
AGLA	37,5	A22	25,0
APAV	75,0	ATA	62,5
AAR	37,5	M06	25,0
ACAR R	37,5	A25	25,0
ACAR N	50,0	A26	25,0
AMA	62,5	A27	25,0
APAR	12,5	A28	25,0
A13	62,5	A29	25,0
A14	37,5	A30	12,5
A15	62,5	A31	25,0
A16	75,0		



**Obrázek 11 – Polyakrylamidový gel; SSR marker AT3D6 (SZ – 20bp velikostní marker, A1 – A22 – analyzovaní jedinci rodu *Aesculus*; A6 – AGLA; A7 – APAV; A8 – AAR; A9,10 – ACAR R/N; A11 – AMA; A12 – APAR)**

#### 5.4 Vyhodnocení genetické diverzity analyzovaných jedinců

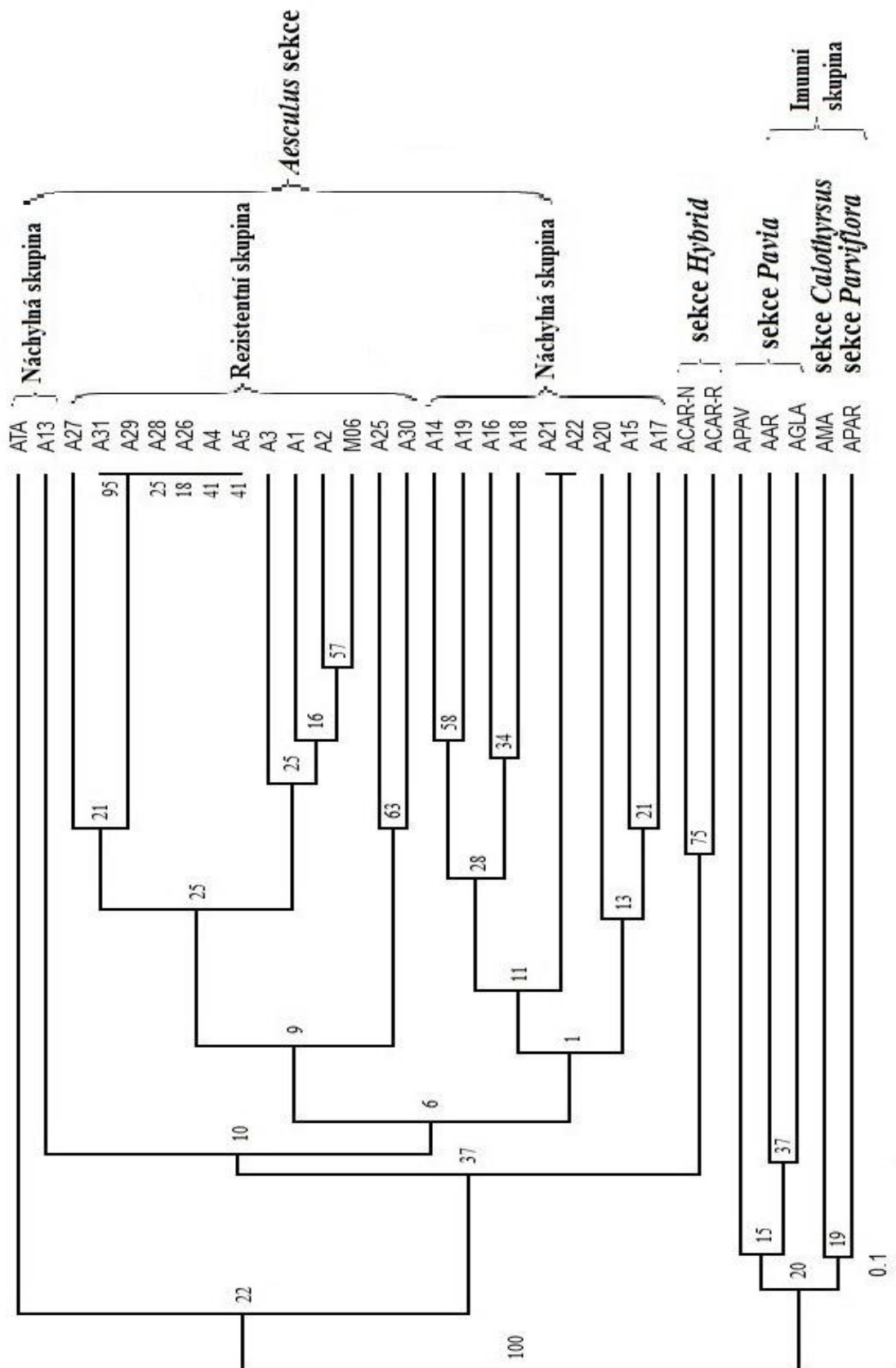
Analýzou mikrosatelitních oblastí a jejich statistickým vyhodnocením došlo ke dvojímu rozlišení, znázorněného v grafu 3. První představuje odlišení náchylných, rezistentních a imunních genotypů, druhé pak druhové rozlišení do 5 sekcí (*Aesculus*, *Pavia*, *Parviflora*, *Calothyrsus* a *Hybrid*), které jsou v korelaci s prvním.

Sekce *Aesculus* zahrnuje jak náchylné, tak i rezistentní genotypy *A. hippocastanum* a *A. turbinata*. Vzhledem k vyhodnocení poškození v rámci této skupiny došlo k rozlišení na dvě menší skupiny, v této práci dále označené jako „náchylná“ a „rezistentní“.

Náchylná skupina představuje jedince s různým stupněm náchylnosti a poškození listového aparátu housenkami klíněnky jírovcové. Všichni jedinci byli vybráni do této studie na základě stavu listové plochy za předchozí vegetační období před měřením infestace, tj. rok 2013, kde v rámci vybraných lokalit bylo jejich poškození menší nebo minováno až při vyšším poškození ostatních jírovců v dané lokalitě. Zajímavou skutečností je odlišení jedince A13 od ostatních genotypů. Tento jedinec vykazoval nižší náchylnost ke klíněnce jírovcové během měření v roce 2014 a jeho listová plocha byla ve srovnání s ostatními genotypy stále dobře zachovalá i vzhledem k pokročilému vegetačnímu období, kdy na konci roku před začátkem dormance dosahovalo poškození maximálně 30% v obou po sobě následujících letech. Avšak, vzhledem k uvedeným hodnotám v kapitole 5.2, nejmenší poškození z celého souboru jírovců vykazoval genotyp A17. Poškození jeho listové plochy nepřesahovalo průměrně 10%. V rámci dendogramu podobnosti však došlo společně s genotypem A14, u kterého bylo oproti ostatním jírovcům naměřeno nižší poškození (méně než 40% na konci vegetace 2014), k přiřazení těchto dvou jedinců do podskupin jírovců, u kterých dochází buď k úplné defoliaci (A18 a A19) nebo poškození listové plochy dosahuje od měsíce srpna více než 50% (A15, A16, A20). I když k vyššímu poškození dochází mnohem později u genotypu A15, který vytváří podskupinu právě s jedincem A17, oba dva jírovce se nacházejí v souboru s jedincem A20, u kterého docházelo k nárůstu poškození pravidelně během každého měření za rok 2014 (za rok 2013 však byla jeho listová plocha méně poškozena, stupeň poškození 8).

Za pozornost stojí donorová rostlina genotypů A21 a A22. Genotyp A21 byl odebrán z poloviny stromu, která je téměř bez příznaku poškození biotickým nebo abiotickým agens. Genotyp A22 byl odebrán z poloviny stromu, u které dochází velmi brzo k defoliaci (červenec, srpen), avšak nikoli vlivem larev klíněnky jírovcové.





**Graf 3 – Dendrogram podobnosti analyzovaných genotypů jírovce**

**Zkratky:** A 1 – A31, M06 – genotypy *A. hippocastanum*; ATA – *A. turbinata*, ACAR R/N – *A. x carnea* rezistentní/náchylný; APAV – *A. pavia*; AAR – *A. glabra* var. *arguta*; AGLA – *A. glabra*; AMA – *A. marilandica*; APAR – *A. parviflora*

Toto chování bylo pozorováno opakovaně 3 roky po sobě. Analýzou mikrosatelitních oblastí byla zjištěna statisticky průkazná shoda, že se jedná o stejný genetický materiál u obou genotypů. Na donorovém jedinci nebyla ale doposud pozorována klíněnka jírovcová. V rámci dendrogramu vytváří oba genotypy menší podskupinu s náchylnými jedinci, včetně genotypu A14. Po konzultaci s paní doc. Šafránkovou bylo zjištěno, že na dané lokalitě je zřejmě velké zasolení. Vzhledem k postupu a tvaru skvrn na listech (data nejsou zahrnuta do hodnocení) postižené poloviny je nutné zvážit i přítomnost patogenního činitele.

Genotyp ATA představuje *A. turbinata*, který je každoročně vystaven masové infestaci klíněnkou, a jeho napadení bývá ke konci vegetačního období na stejné úrovni, jako u ostatních náchylných genotypů. V rámci druhového rozlišení však došlo k jeho statisticky průkaznému odlišení od *A. hippocastanum*.

Do rezistentní skupiny byli začleněni jedinci s rozdílným stupněm odolnosti ke klíněnce jírovcové, jejichž poškození bylo vyhodnoceno v kapitole 5.1. V této skupině lze pozorovat rozlišení genotypů do tří menších podskupin. První menší podskupinu představuje rezistentní kultivar jírovce maďalu M06 a jeho semenáči, rezistentní A1 a náchylní A2, A3. V této podskupině došlo k rozlišení náchylných a rezistentních genotypů mezi sebou a semenáčů od mateřské rostliny M06. Zajímavou skutečností je, že semenáč A2 vykazující v podmínkách umělé infestace náchylné chování, je v rámci SSR analýz podobný M06 více, než genotyp A1 s rezistentním chováním. Druhou menší podskupinu představuje genotyp A26 s vyšší stupněm rezistence, který sloužil jako donorový materiál pro jeho roubovance. Ti se vyznačují rozdílným chováním k larvám klíněnky. Kromě roubovance A4, který stejně jako donorová rostlina v podmínkách umělé infestace vykazoval rezistentní chování, bylo u ostatních jedinců A5, A28, A29, A30 a A31 pozorováno náchylné chování. U všech roubovanců byl zjištěn stejný mikrosatelitový profil, jako u donorové rostliny A26. Pouze genotyp A30 se odlišuje ve třech lokusech uvedených v předchozí kapitole. Genotyp A30 navíc tvoří samostatnou podskupinu s genotypem A25, u kterého nebyla zjištěna přítomnost klíněnky v opadaném listí a zároveň nebyla prokázána náchylnost k tomuto drobnému fytofágovi. Genotyp A25 se opakovaně zařazuje mezi rezistentní genotypy, které představuje rezistentní skupina.

Velmi k významnému rozlišení došlo u genotypu A27. Tento genotyp se projevuje rezistentním chováním za poslední tři vegetační období a miny v listech

nemají typický tvar jako u náchylných jedinců (Obr. 10). Tento jedinec se navíc pomocí mikrosatelitních analýz zařadil rovněž do rezistentní skupiny, kde vytváří podskupinu společně s genotypem A26 a jeho roubovanci. V rámci této podskupiny však tvoří samostatnou větev.

V „imunní“ skupině se nacházejí druhy rodu *Aesculus*, u kterých nedochází k vývinu larev, a byl proto zvolen i odpovídající název skupiny. Jedná se o sekce *Pavia*, *Calothyrsus* a *Parviflora*. V sekci *Pavia* došlo ke správnému rozdělení, kde *A. glabra* a jeho varieta *A. glabra* var. *arguta* vytvořily v rámci sekce svoji podskupinu. Do této sekce se pak správně zařadil i *A. pavia*. V rámci celé Imunní skupiny pak *A. marilandica* a *A. parviflora* vytvořily rovněž skupinu, u které by zřejmě při analýze většího počtu příbuzných jedinců došlo k rozlišení do dvou podrobnějších podskupin.

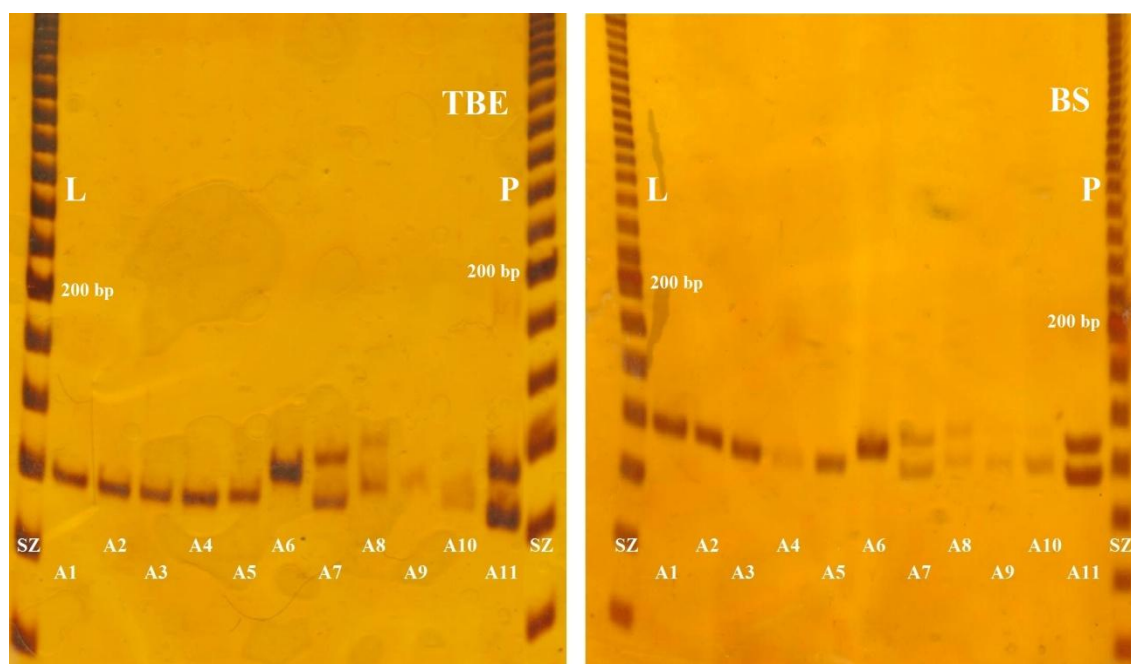
Poslední nediskutovanou sekci *Hybrid* tvoří dva jedinci, *A. x carnea* s rezistentním chováním (ACAR R) a *A. x carnea* náchylný (ACAR N), u kterého bylo při hodnocení úrovně minování zjištěno 1 – 5% poškození listového aparátu za rok 2014 v přirozených podmínkách. *A. x carnea* vznikl křížením *A. hippocastanum* x *A. pavia*. Začlenění této sekce do skupiny *Aesculus* nám naznačuje, že v případě studovaných mikrosatelitních oblastí je větší podobnost s *A. hippocastanum*. Současně došlo u těchto dvou jedinců k vzájemnému odlišení na úrovni SSR markerů při rozdílném chování ke klíněnce.

## 5.5 Srovnání alternativních pufrů během elektroforetické separace

Při testování elektrolytických pufrů byla zjištěna stejná doba separace (105 minut) pro lokus AT6D8, která je dostačující k rozlišení velikosti každého amplikonu jak pro TBE, tak i pro SB pufr. Velikost fragmentů analyzovaného lokusu všech jedinců v této práci se pohybuje v rozmezí 120 – 160 bp. U vybraných jedinců pro testování uvedených elektrolytů se pohybuje velikost v rozmezí 135 – 150 bp.

Z uvedených výsledků (Obr. 12) je možné pozorovat termální výkyvy pro oba pufrы, které měly na separaci v polyakrylamidovém gelu deformační účinek, zejména po levé a pravé straně v oblasti velikostních markerů. Pro pufr TBE došlo k největší deformaci a k tzv. „smile efektu“ u velikostního markeru (dále je SZ) na pravé (P) straně gelu. Na levé (L) straně je 140 bp fragment SZ 140 v úrovni separovaných amplikonů A1 – A11, avšak na pravé straně je téměř o 20 bp nad touto úrovní. K malé deformaci došlo také u jednotlivých amplikonů, zejména na léve straně pro A1 – A3 a

na straně pravé pro amplikony A8 – A11. Vzorky A8 – A10 jsou navíc mnohem méně zřetelné.



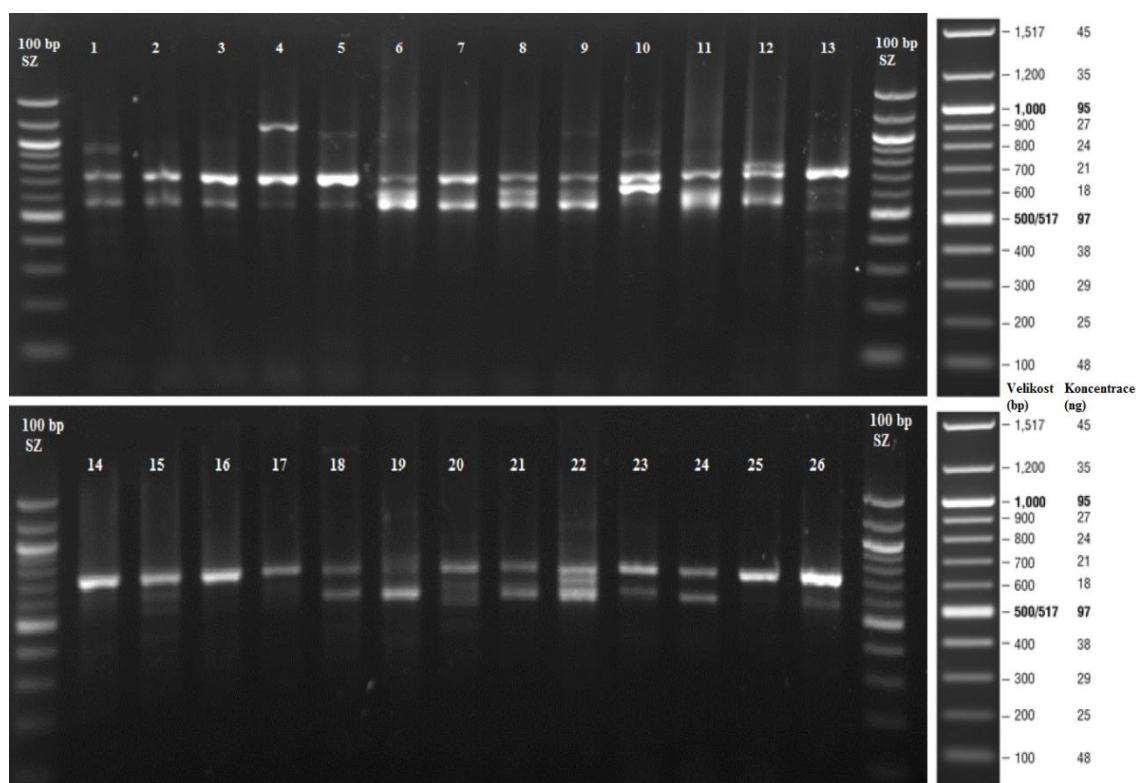
**Obrázek 12 – Srovnání úspěšnosti TBE a SB pufru během elektroforetické separace; TBE – Tris, kys borita, ethylendiamintetraoctová kyselin (disodium); L, P – levá/pravá strana; SB – tetraboritan sodný; SZ – 20 bp velikostní marker; A1 – A11 – genotypy jírovce maďalu; A6 – AGLA; A7 – APAV; A8 – AAR; A9,A10 – ACAR R/N; A11 – AMA**

Separace PCR produktů v prostředí SB pufru proběhla za stejných podmínek jako pro separaci v TBE. Pro SB pufr je gelová deformace nejvíce zřejmá na levé straně u velikostního markeru. Velikostní fragment 140 bp je však ve stejné úrovni po obou stranách, jako separované amplikony, u kterých došlo rovněž ke „smile efektu“, a proto je odečtení velikosti a vyhodnocení mnohem přesnější, oproti vyhodnocení separovaných produktů v TBE pufru. Avšak ostrost a zřetelnost všech vzorků na polyakrylamidovém gelu je pro SB pufr slabší než pro TBE. Špatnou zřetelnost je možné pozorovat u separovaných PCR produktů A4 a A7 – A10, které jsou však méně zřetelné i v případě separace v prostředí TBE.

## 5.6 Vyhodnocení klonovací reakce

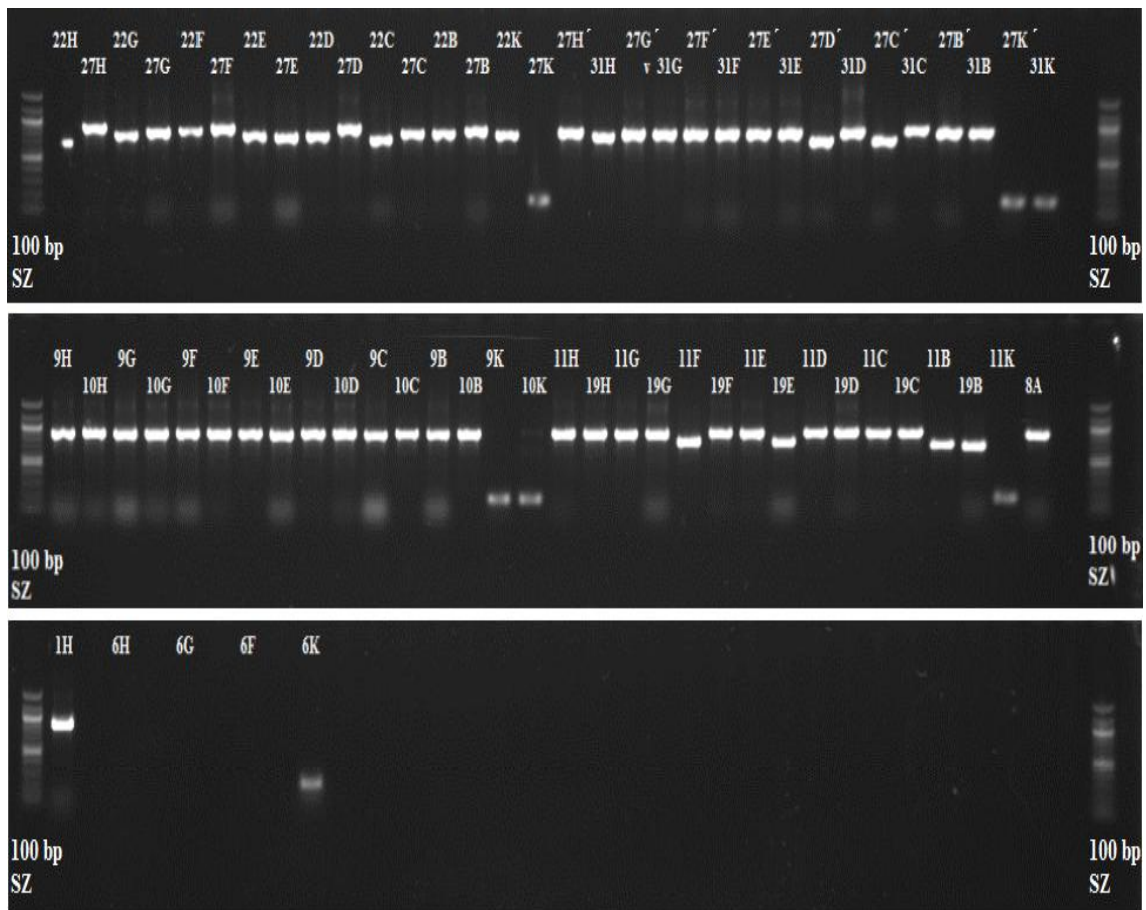
Po prvotní amplifikaci ITS1 – 5.8S – ITS2 oblasti pomocí PCR bez použití vnitřních specifických primerů byla získána část amplikonů (Obr. 13) o dostatečné koncentraci i kvalitě pro přímé sekvenování po purifikaci. U vzorků, pro které byla síla amplikonů příliš slabá nebo se v oblasti 700 bp vyskytovalo větší množství fragmentů, byla zvolena více specifická PCR s postupně zvyšující iniciační denaturací. Vzorky, které

byly nadále vyhodnoceny jako nevhodné pro sekvenování, byly následně inzertovány do vektoru pGEM-T a klonovány v bakteriích *E. coli*.



**Obrázek 13 – Separované produkty po PCR z genomické DNA; SZ – 100 bp velikostní marker; 1 – 26 – genotypy jírovců A1 – A26; 6 – AGLA; 7 – APAV; 8 – AAR; 9,10 – ACAR R/N; 11 – AMA; 12 – APAR**

Klonováním byly získány amplikony téměř u všech genotypů v průměrné koncentraci 50 ng/μl o správné čistotě i velikosti (Obr. 14). Vzhledem k částečné amplifikaci i vektorové sekvenci je velikost všech inzertovaných fragmentů v průměru o 150 – 200 bp větší než u fragmentů získaných přímou amplifikací z genomické DNA. Vzorky 22K, 27K, 27K, 31K, 9K, 10K, 11K a 6K byly vybírány z modrých kolonií produkujících β – galaktosidázu, a slouží jako kontroly uvedených řad se stejným číselným indexem. Velikost těchto fragmentů je v rozmezí 150 – 200 bp, kromě kontroly 22K, u které zřejmě došlo k částečné ligaci inzertu, avšak bez přerušení genu lacZ. Pro genotyp AAR (fragment 8A) a genotyp 1A (fragment 1H) se nepodařilo nakultivovat modrou kolonii kvůli nízké výtěžnosti klonování (byla získána pouze 1 bílá kolonie pro oba uvedené vzorky). Pro genotyp AGLA (6H, 6G, 6F) se nepodařilo získat žádnou kolonii s ligovaným inzertem, byla získána pouze kontrolní kolonie 6K. Pro purifikaci a sekvenování byly vybrány vzorky, jejichž velikost odpovídala 850 – 900 bp.

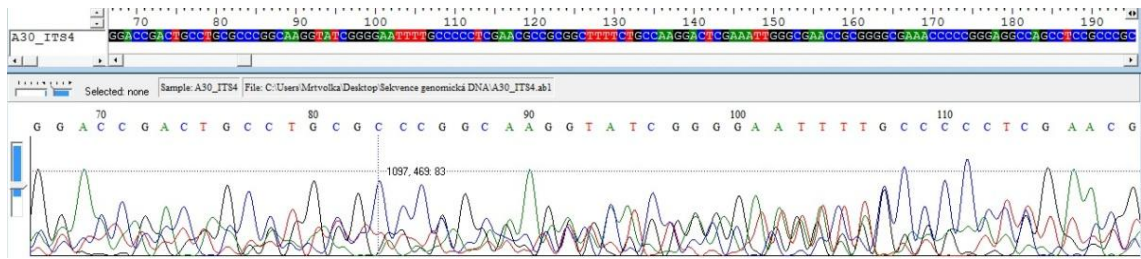


Obrázek 14 – Amplikony PCR po klonování DNA v kulturách *E. coli*; SZ – 100 bp velikostní marker; 1 – 31 – genotypy jírovců A1 – A31; 6 – AGLA; 8 – AAR; 9,10 – ACAR R/N; 11 – AMA; písmena za čísly A – H – pozice vzorků na PCR plátičku (12 x 8)

## 5.7 Analýza získaných sekvencí

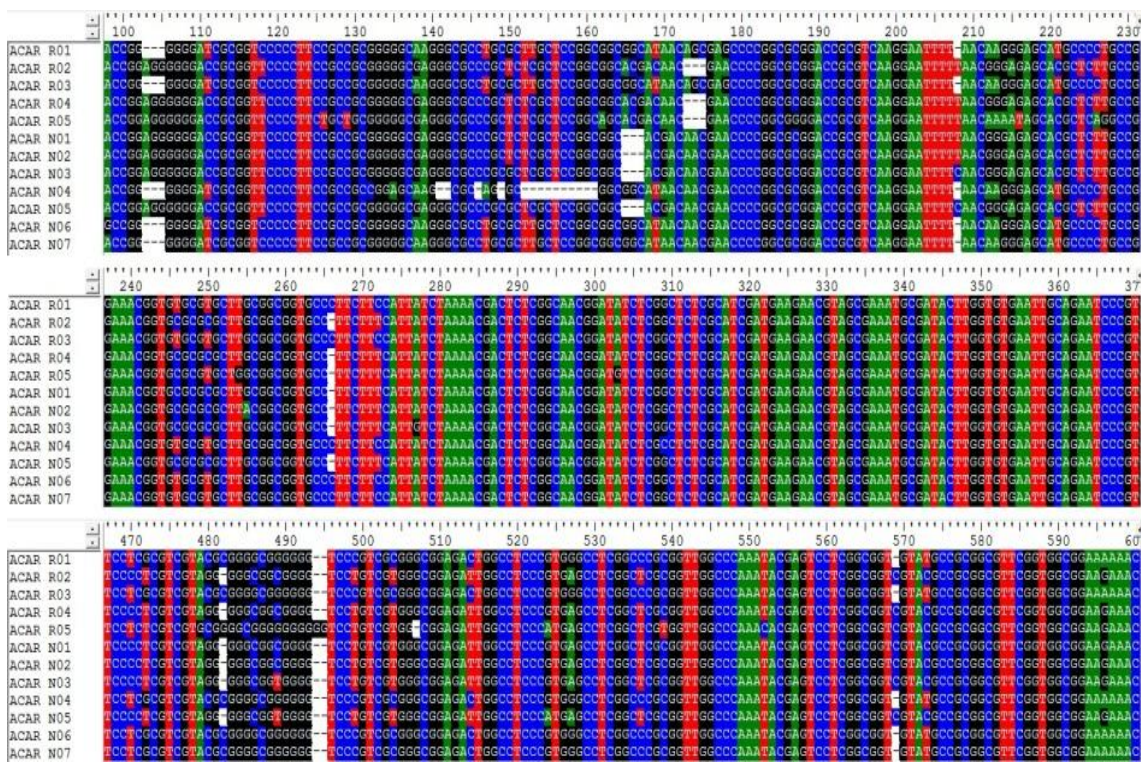
Většina získaných sekvencí byla dobře čitelných. Z genomické DNA bylo čitelných 20 z 21 sekvencí, kde u sekvence genotypu A30 byl velký výskyt překryvů, které způsobovaly nejednoznačnou čitelnost (Obr. 15). U sekvencí druhu *A. parviflora* a genotypů A28 a A29 byly získány pouze oblasti ITS2, zbylá část sekvencí již byla nečitelná. Z klonování byla úspěšnost získaných sekvencí o dobré čitelnosti nižší. Pouze 34 získaných sekvencí z celkového počtu 48 odpovídalo zvoleným genotypům rodu *Aesculus*. Ostatní sekvence byly buď nečitelné, nebo v rámci klonování byla získána sekvence odlišného druhu, jako např. savenky finské (*Euseius finlandicus* Oudesman), kde byla v databázi NCBI nalezena 99% shoda.





**Obrázek 15 - Příklad špatně čitelné sekvence genotypu A30**

Pro každou sekvenci náchylných genotypů hybridního druhu *A. x carnea* byly vybrány do databáze NCBI pouze ty, které vykazovaly nejvíce polymorfizmů – ACAR R01/02/05 a ACAR N05/06. Srovnáním sekvencí vnitřních transkribovaných mezerníků byly nalezeny četné polymorfnní místa vzniklé delecemi nebo insercemi v rozsahu 1 – 10 bp, jako je tomu v případě nejdelší delece u sekvence ACAR N04 v rozmezí 152 – 162 bp (Obr. 16). Pro sekvence ACAR R/ACAR N byly detekovány rovněž četné jednobodové mutace, nejvíce pak v oblasti 200 – 220 bp, 250 – 270 bp a 470 – 490 bp pro všechny klonované lokusy.

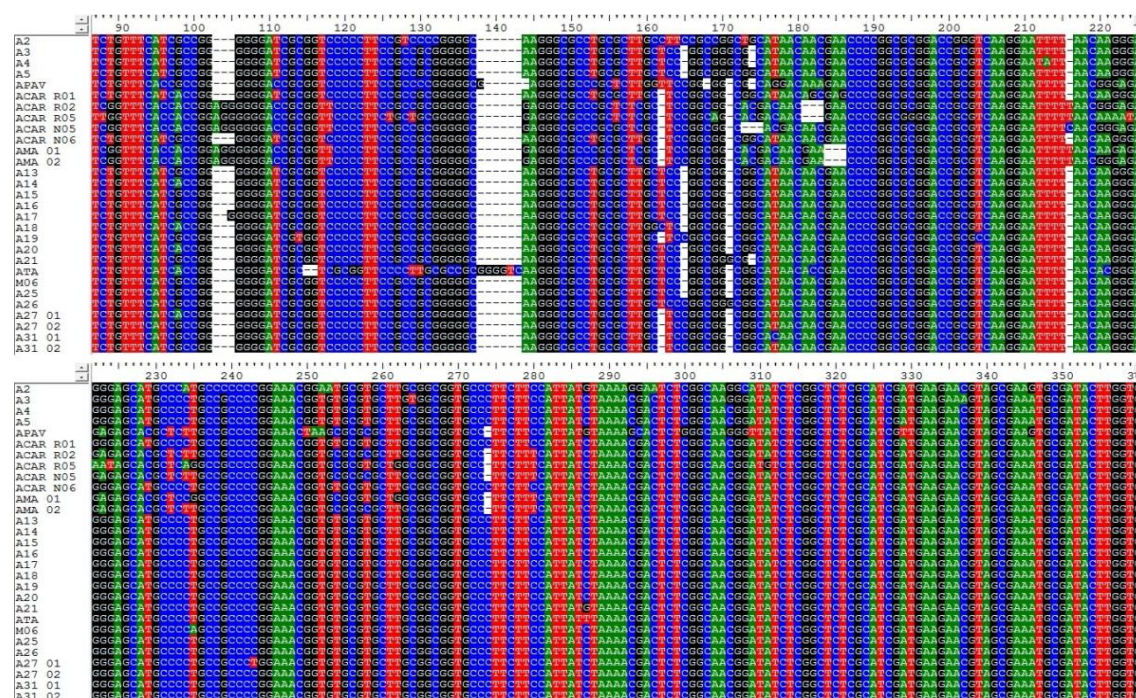


**Obrázek 16 – Polymorfnní sekvence hybridního druhu *A. x carnea*; ACAR R01 – 05/ACAR N01 – 07 – rezistentní a náchylný genotyp, číselné indexy 0X značí osekvenované kolonie**

Ostatní sekvence, získané klonováním, byly rovněž porovnány, a v případě vyššího počtu indelů a jednobodových polymorfizmů následně srovnány s celým souborem. Z klonovací reakce byly vyhodnoceny jako nejvíce polymorfnní klony sekvencí A19 a AMA 01/02, A27 01/02, A31 01/02.



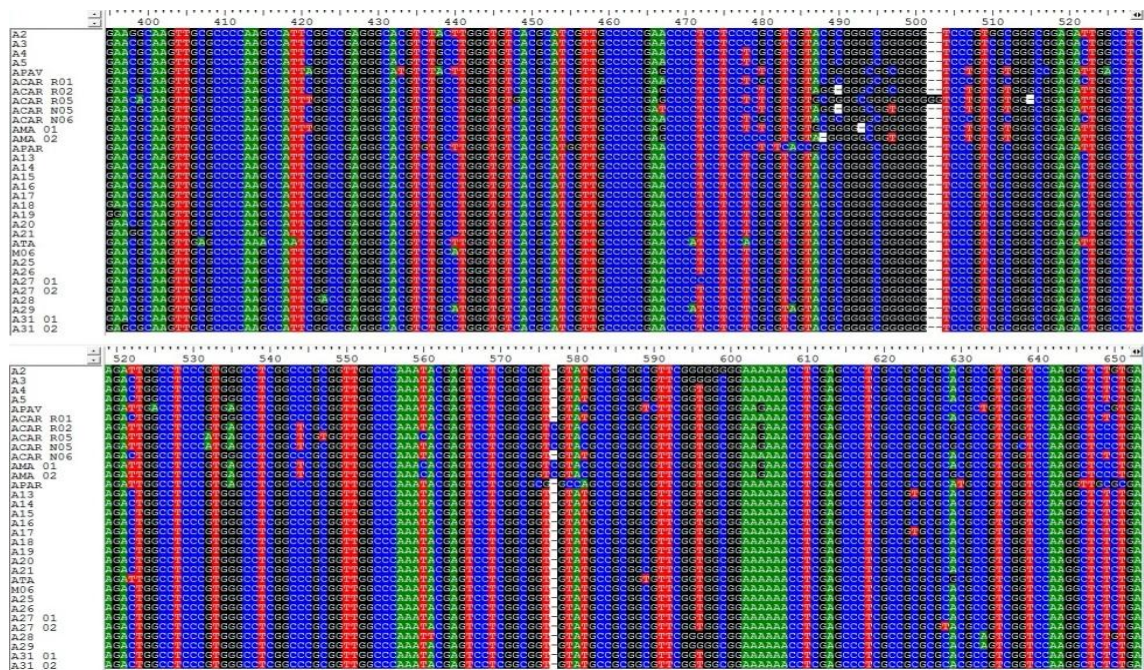
Srovnáním všech uvedených sekvencí ITS1 (Obr. 17) byl nalezen specifický 6 bp lokus pro *A. turbinata* (ATA) a to v oblasti 138 – 143 bp. U sekvencí ACAR R02, ACAR R03, ACAR N05, AMA 01 a AMA 02 byla detekována 3 bp inzerce AGG, která se u žádné další sekvence již nevyskytuje. Pro tyto sekvence se 1 nukleotidová inzerce následně opakuje v oblasti 216 bp. Jako nejvariabilnější místo lokusu ITS1 lze označit oblast 152 – 186 bp, kde je možné u všech sekvencí pozorovat kromě indelů i velký počet jedno- a dvoubodových mutací. Za variabilní oblast lze také označit lokusy 222 – 241 bp a také 249 – 275 bp, které jsou nejvíce proměnlivé pro sekvence genotypů ACAR R/N a AMA.



**Obrázek 17 – Srovnání sekvencí ITS1 a vybraných klonů; A1 – A31, M06 – genotypy druhu *A. hippocastanum*; APAV – *A. pavia*; ACAR R/N – rezistentní/náchylný genotyp *A. x carnea*; AMA - *A. marilandica*; číselné indexy 0X značí osekvenované kolonie**

Srovnáním ITS2 oblastí (Obr. 18) u analyzovaných genotypů byla zjištěna daleko menší variabilita, než u ITS1. Jednobodové mutace se vyskytují u jednotlivých sekvencí v rámci celé této oblasti. Nejvyšší variabilita může být pozorována v oblasti 467 – 501 bp, kde byla pro sekvenci ACAR N05 nalezena dvounukleotidová inzerce. Četné mutace lze pak pozorovat v oblasti 520 – 515 bp, 532 – 537 bp, 560 bp, 574 – 581 bp a v oblasti 595 – 604 bp. Nejvíce mutací bylo vypočteno u sekvencí genotypů APAV, ACAR R/N, AMA a APAR.





**Obrázek 18 – Srovnání sekvencí ITS2 a vybraných klonů; A1 – A31, M06 – genotypy druhu *A. hippocastanum*; APAV – *A. pavia*; ACAR R/N – rezistentní/náchylný genotyp *A. x carnea*; AMA - *A. marilandica*; APAR – *A. parviflora*; číselné indexy 0X značí vybrané osekvěňované kolonie**

V tabulce 16a/b je uvedena podobnost dobře čitelných sekvencí sekvencí, které byly porovnány v NCBI se sekvencemi druhů *A. hippocastanum* (taxid:43364), *A. turbinata* (taxid:83375), *A. turbinata* Blume (taxid:83375), *A. pavia* (taxid:43872), *A. chinensis* (taxid:83375), *A. glabra* (taxid:322042), *A. parviflora* Walt. (taxid:322043), *A. flava* (taxid:322040). Pro druh *A. glabra* var. *arguta* byla nalezena pouze sekvence hybridního druhu *A. glabra* var. *arguta* x *A.esculus pavia* (taxid:322033). Pro druh *A. x carnea* nebyla nalezena žádná sekvence. Pro větší přesnost byla každá oblast ITS1 – 5.8S – ITS2 porovnávána zvlášť.

V rámci všech druhů byla zjištěna rozdílná variabilita. Největší byla zjištěna u *A. x carnea*, kde všechny klonované sekvence byly zjištěny jako rozdílné. Největší homogenita byla nalezena pro genotypy *A. hippocastanum*.

**Tabulka 16a – Výstup srovnání sekvencí v databázi NCBI vyhledávacím algoritmem BLAST**

Genotyp	Délka bp	Podobnost	Oblast nrDNA	Max. skóre	Total. skóre	Oblast srovnané sekvence%	E hodnota	Identita %	Kód sekvence
A2	682	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	298	298	31	2,00E-81	92	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	255	255	22	1,00E-68	96	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	326	326	28	1,00E-89	97	EU687636.1
A3	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	351	351	31	2,00E-98	96	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	283	283	23	6,00E-77	99	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	342	342	28	1,00E-95	99	EU687636.1
A4	679	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	351	351	31	2,00E-97	96	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	291	291	23	4,00E-80	99	EU687672.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A5	681	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	31	8,00E-101	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
APAV	677	<i>A. pavia</i>	ITS1	281	281	28	2,00E-76	90	EU687605.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	243	243	23	1,00E-65	94	EU687672.1
		<i>A. pavia</i>	ITS2	303	303	28	5,00E-83	95	EU687641.1
ACAR R01	726	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	351	351	29	2,00E-98	96	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	4,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	26	5,00E-99	100	EU687636.1
ACAR R02	726	<i>A. pavia</i>	ITS1	418	418	31	2,00E-118	100	EU687605.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	289	289	21	1,00E-79	99	EU687664.1
		<i>A. pavia</i>	ITS2	353	353	26	5,00E-99	100	EU687641.1
ACAR R05	728	<i>A. flava</i>	ITS1	348	348	31	2,00E-97	94	EU687610.1
		<i>A. parviflora</i>	5.8S	274	274	21	4,00E-75	97	EU687672.1
		<i>A. flava</i>	ITS2	305	305	26	1,00E-84	95	EU687647.1
ACAR N05	726	<i>A. flava</i>	ITS1	412	412	31	8,00E-116	99	EU687611.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. pavia</i>	ITS2	331	331	26	2,00E-91	98	EU687641.1
ACAR N06	726	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	368	368	29	2,00E-103	98	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	26	5,00E-99	100	EU687636.1
AMA 01	726	<i>A. flava</i>	ITS1	403	403	31	5,00E-113	99	EU687610.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-81	100	EU687664.1
		<i>A. flava</i>	ITS2	342	342	26	1,00E-94	98	EU687647.1
AMA 02	726	<i>A. flava</i>	ITS1	418	418	31	2,00E-118	100	EU687611.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. flava</i>	ITS2	337	337	26	5e-94098	98	EU687641.1
APAR	411	<i>x</i>	ITS1	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	283	283	38	4,00E-77	99	EU687652.1
		<i>A. parviflora</i>	ITS2	270	270	45	3,00E-73	93	EU687632.1
A13	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	368	368	31	2,00E-103	98	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	348	348	28	3,00E-97	99	EU687636.1
A14	682	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	31	8,00E-101	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A15	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	368	368	31	2,00E-102	98	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A16	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	368	368	31	2,00E-102	98	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A17	681	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	31	9,00E-102	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	348	348	28	3,00E-97	99	EU687636.1

**Tabulka 16b – Výstup srovnání sekvencí v databázi NCBI vyhledávacím algoritmem BLAST (pokračování)**

Genotyp	Délka bp	Podobnost	Oblast nrDNA	Max. skóre	Total. skóre	Oblast srovnané sekvence %	E hodnota	Identita %	Kód sekvence
A17	681	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	31	9,00E-102	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	348	348	28	3,00E-97	99	EU687636.1
A18	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	351	351	31	2,00E-97	96	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A19	725	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	357	357	29	4,00E-100	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	289	289	21	1,00E-79	99	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	26	5,00E-99	100	EU687636.1
A20	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	31	9,00E-102	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	6,00E-99	100	EU687636.1
A21	679	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	351	351	31	2,00E-98	96	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	289	289	23	2,00E-79	99	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	6,00E-99	100	EU687600.1
ATA	684	<i>A. turbinata</i>	ITS1	318	318	29	2,00E-87	95	EU687597.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	267	267	23	7,00E-72	97	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	326	326	27	1,00E-89	97	EU687636.1
M06	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	31	8,00E-101	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	289	289	23	1,00E-78	99	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A25	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	368	368	31	2,00E-102	98	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	23	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A26	680	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	359	359	31	1,00E-99	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	291	291	23	4,00E-79	99	EU687672.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	28	5,00E-98	100	EU687636.1
A27 01	726	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	357	357	29	4,00E-100	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	348	348	26	2,00E-97	99	EU687636.1
A27 02	726	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	29	8,00E-102	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-81	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	348	348	26	2,00E-97	99	EU687636.1
A28	413	x	ITS1	x	x	x	x	x	x
		<i>A. flava</i>	5.8S	246	246	38	5,00E-66	94	EU687672.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	337	337	46	3,00E-93	98	EU687636.1
A29	413	x	ITS1	x	x	x	x	x	x
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	278	278	38	2,00E-75	98	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	331	331	46	1,00E-91	98	EU687636.1
A31 01	726	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	363	363	29	9,00E-101	97	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	294	294	21	3,00E-80	100	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	26	5,00E-98	100	EU687636.1
A31 02	726	<i>A. hippocastanum</i>	ITS1	368	368	29	2,00E-103	98	EU687600.1
		<i>A. chinensis</i>	5.8S	289	289	21	1,00E-79	99	EU687652.1
		<i>A. turbinata</i>	ITS2	353	353	26	5,00E-99	100	EU687636.1

**Zkratky:** A2 – 31, M06 – genotypy *Aesculus hippocastanum*; ATA – *A. turbinata*, ACAR R/N – *A. x carnea* rezistentní/náchylný; APAV – *A. pavia*; AAR – *A. glabra* var. *arguta*; AMA – *A. marilandica*; APAR – *A. parviflora*; číselné indexy 0X značí vybrané osekvenované kolonie; x – nečitelná sekvence

## 6 DISKUSE

Cílem této práce byla molekulární analýza vybraných druhů rodu *Aesculus* a jejich genotypů s rozdílnou náchylností ke klíněnce jírovcové. Předložené výsledky hodnocení listové plochy v kapitolách 5.1 a 5.2 mají doplňující charakter k molekulární části a představují chování jírovců s rozdílnou náchylností na různých stanovištích.

Fenotypové rozlišení jedinců na náchylné a rezistentní bylo umožněno stanovením stupnice napadení listové plochy 1 – 9, jejíž parametry byly stanoveny poškozením a softwarovým zpracováním listových pletiv. Ve srovnání se stupnicí Gilbert & Grégoire (2003) má tato stupnice mnohem přísnější parametry. V uvedené práci je hodnoceno celé spektrum poškození 0 – 100% pro stupnici 0 – 8. Při infestaci však dochází velmi často k téměř úplnému poškození, proto přísnější hodnocení lépe vystihuje rezistenci a náchylnost.

Samotné chování jírovců může být ovlivněno celou řadou faktorů, stejně jako infestace klíněnkou jírovcovou. Nejvýznamějším faktorem jsou v tomto případě klimatické podmínky. Jak uvádí Mrkva (1999), k líhnutí imag dochází při průměrné denní teplotě 10°C, kdy termín rojení i líhnutí vajíček je ovlivněno teplotní dynamikou. Na termín rojení a tedy i výskytu klíněnky na dané lokalitě má velký vliv i nadmořská výška, kde posunem o jeden stupeň na sever a zvýšením o 100 m může dojít ke zpoždění o 3 – 4 dny. Vzhledem k vývoji teplot na uvedených lokalitách je vysoce pravděpodobné, že menší výskyt min na listech genotypů A13, A14, A17a A27 bude ovlivněn teplotou. Nováková (2008) uvádí, že k výraznému úbytku min dochází při průměrné teplotě za vegetační období 14,0 – 14,5°C. Velký vliv na začátek infestace má i odklizení opadaného listí, které oddaluje opad listů následující rok o 10 – 20 dní (Trandžík, 2005). V případě ověřování odolnosti nebo náchylnosti je nutné využití systému umělé infestace pro ověření stability rezistence a omezení vnějších faktorů, zasahujících do průběhu infestace v případě jírovců, vykazujících nízký stupeň napadení (Mertelík, ústní sdělení), jako je tomu u výše zmíněných jedinců. U genotypů A26 a rezistentních roubovanců, stejně jako u rezistentních semenáčků M06, kteří vykazují nižší poškození v přítomnosti klíněnky, lze předpokládat výskyt sekundárních metabolitů v jejich listech. Nejezchlebová (2011) detekovala u některých odolných druhů rodu *Aesculus*, včetně rezistentního kultivaru M06 vyšší hladinu diglykosidu kverticinu, vyšší hladiny kyseliny chlorgenové a escinu.

Analýzou mikrosatelitních markerů bylo v celém souboru detekováno 347 alely, Na jeden lokus připadá v průměru 43,38 alely. V práci Minami *et al.* (1998) bylo

detekováno 18 alel na lokus při studiu 43 jedinců *A. turbinata* použitím deseti SSR markerů, přičemž osm nejvíce polymorfních lokusů bylo použito pro tuto studii. V práci Isagi *et al.* (2007) bylo šesti stejnými SSR markery detekováno 19,3 alely na lokus u 221 jedinců při studiu genetické variability *A. turbinata*. U druhů *A. flava*, *A. pavia*, *A. sylvytica* a jejich kříženců amplifikovali Thomas *et al.* (2008) použitím stejných SSR markerů, jako v této práci, v průměru 15 – 35 alel na lokus u 391 jedinců (24 populací). Ve srovnání s předchozí prací Bačovský (2013), kde bylo detekováno celkem 28 alel u 3 různých genotypů *A. hippocastanum*, *A. turbinata* a jejich klonů získaných cestou somatické embryogeneze a organogeneze, vykazuje analyzovaný soubor vysokou úroveň polymorfizmu. Tuto úroveň potvrzují i průměrné hodnoty pro jednotlivé SSR markery: DI 0,62; PI 0,15 a PIC 0,60. Tato poměrně vysoká variabilita byla dosažena různorodostí studovaného souboru jak na úrovni vnitrodruhové, tak i na úrovni mezidruhové, kdy pro studovaný soubor 25 různých genotypů s rozdílnou rezistencí ke klíněnce jírovcové bylo zvoleno 8 různých druhů rodu *Aesculus* (celkem 31 analyzovaných jedinců).

Zóna amplikonů o velikost 140 bp, detekovaná primerovou kombinací AT7D8, nebude oblastí 126 bp popsané v práci Minami *et al.* (1998), která byla v rámci SSR analýz rovněž identifikována. Tato primerová kombinace zřejmě nasedá pro tento lokus na dvě místa. V rámci dalších analýz by bylo vhodné tuto oblast osekvenovat nebo vyzkoušet širší spektrum teplot pro primerovou hybridizaci s templátovou DNA jako v práci Ondroušková (2011), kde pro optimalizaci nasedání primerů byla využita gradientová PCR. Rozlišením genotypu A30 od rostliny A26, která byla původně označena jako donor, bylo zpětně zjištěno, že v rámci kolekce genetického materiálu došlo k záměně jednoho ze semenáčků za roubovance. Tento výsledek ukazuje na využití SSR markerů pro dostatečně průkazné rozeznání roubovanců od semenáčů, tedy geneticky homogenního materiálu od geneticky heterogenního.

V rámci dendogramu podobnosti došlo k rozlišení všech analyzovaných jírovců do tří skupin – rezistentní, náchylná a imunní. Podobného rozlišení bylo dosaženo i v předchozí práci Bačovský (2013) a v práci Vyhnánek *et al.* (2013). Pomocí mikrosatelitních markerů byly rozlišeny druhy *A. turbinata* a *A. hippocastanum*, a zároveň byly rozděleny do jednotlivých skupin dle jejich náchylnosti. Irzykowska *et al.* (2013) pomocí technik RAPD a SRAP rozlišili polymorfní lokusy 14 rozdílných genotypů druhu *A. x carnea* a 26 genotypů *A. hippocastanum* s rozdílnou náchylností ke klíněnce a padlí, které doporučují při genotypování nových, méně náchylných jírovců.

Rozlišení na mezi- a vnitrodruhové úrovni pomocí SSR markerů umožňuje jejich vysoká mutační rychlost, která dosahuje  $10^{-3}$  až  $10^{-4}$  na lokus za generaci (Provan *et al.*, 1999). Výsledky této analýzy ukazují zvolené mikrosatelity jako vhodný marker pro genotypování zástupců rodu *Aesculus* s rozdílnou náchylností, když genotyp A26 a A27, vykazující stabilně menší poškození byly zařazeny do rezistentní skupiny.

Srovnáním alternativních pufrů pro genetické analýzy byly zjištěny gelové deformace jak pro SB pufr, tak i pro klasický TBE, avšak v prostředí SB pufru docházelo k daleko menším deformacím v boční oblasti velikostních markerů. Jak uvádějí v práci Brody & Kern (2004a), vyšší termostabilní aktivita SB pufru je dána pomalým uvolňováním volných borátových iontů do prostředí, které se mohou následně vázat na molekuly DNA, čímž zvyšují jejich elektronegativitu, ale zároveň i jejich hmotnost a objem. Pomalým uvolňováním borátových iontů dochází zároveň k pomalejšímu vyčerpávání volných aniontů na katodálním konci elektroforézy a umožňuje delší průběh elektroforézy bez recirkulace nebo nebo doplnění jako v případě TAE a TBE pufrů (Broody & Kern, 2004b), které jsou i mnohem dražší při vyšší frekvenci používání.

Pomocí mikrosatelitních markerů došlo zároveň k rozlišení druhů do pěti sekcí *Aesculus*, *Pavia*, *Calothyrsus*, *Parviflora* a *Hybrid*. Stejného rozdělení + sekce *Paryana* dosáhli ve své práci Xiang *et al.* (1998) srovnáním *matK* a ITS sekvencí. Analýzou sekvenčních oblastí *matK*, *trnHK*, *rps16*, ITS a LFY Harris (2007) rozdělil druh *Aesculus* do všech zmíněných sekcí, kromě *Hybrid*, kde pro tuto studii nebyly vybráni žádní hybridní jedinci. Klonovací reakcí ITS oblasti v této studii pak ukázalo vnitřní variabilitu jak pro ITS1, tak i pro ITS2 všech genotypů a zejména pak hybridního druhu *A. x carnea*. Detekcí druhu savenky finské, která je predátorem drobných škůdců jako např. druhu *Tetranychus urticae* Koch aj., vyskytujících se běžně během vegetace na celé řadě plodin i okrasných rostlin, bylo dokázáno, že technika klonování je vhodná při amplifikaci malého množství nativní DNA. Ačkoli byly dodržovány správné izolační i klonovací protokoly, byl zřejmě při odběru vzorků s listy odebrán i tento malý predátor nebo alespoň jeho malá část, která byla izolována DNeasy® Plant Mini kitem od firmy Qiagen. Ligací do vektoru bylo následnou amplifikací množství původní templátové DNA mnohonásobně zvýšeno. Zamezení vstupu nežádoucí DNA uvádí v práci Zhang *et al.* (2006), kde sekvenování genomické DNA z jediné buňky aReal-time izotermální klonové amplifikace došlo k eliminaci cizorodé DNA. Ze získaných výsledků můžeme usoudit, že pro studované genotypy hybridního druhu *A. x carnea* nebyly

koordinovanou evolucí doposud homogenizovány oblasti vnitřních transkribovaných mezerníků. Pro každou oblast v rámci každého klonu byla v genové databázi nalezena rozdílná shoda. Podobnost podjednotky 5.8S u většiny sekvencí ukazuje spíše její konzervativnost. V rámci této oblasti byly objeveny pouze jednobodové polymorfizmy. Z uvedených výsledků je i patrná vyšší substituční rychlost pro ITS1 mezerníky než pro ITS2 (častá 100% shoda ITS2 oblasti v genové databázi). Tuto skutečnost potvrzují ve své práci i Blaaid *et al.* (2013) srovnáním 134 692 vnitřních transkribovaných mezerníků. Fylogram příbuznosti taxonů nebyl sestaven z důvodu nutnosti porovnání nrDNA se sekvencemi cpDNA, jako v případě výše zmíněných studií.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium genetické diverzity jírovce maďalu a některých druhů rodu *Aesculus*. Cílem bylo zjistit úroveň genetické variability u vybraných jedinců s rozdílnou náchylností k fytofágu *C. ohridella* na různých stanovištích.

V rámci hodnocení listových pletiv byl zjištěn rozdílný vývoj min u jedinců hodnocených v přirozených podmínkách. Tento vývoj odpovídá průběhu teplot v rámci každé lokality, kde velký vliv na počátek infestace mělo odklizení opadaných listů v minulém roce. „Zdánlivě okamžitá“ infestace byla způsobena velkým počtem min během posledního hodnocení. Podle zjištěných hodnot nárůstu listového poškození se jeví úhrn srážek bez většího vlivu na úroveň minování, avšak tato hypotéza by měla být ověřena testováním viability, respektive mortality larev během vegetace. Stanovenou stupnicí poškození ze získaných výsledků bude nadále možné hodnotit výskyt klíněnky a vybírat tak méně poškozené jedince pro srovnávací analýzy. U všech takto zařazených jírovců však bude nutné provést testování stability rezistence v podmínkách umělé infestace, které vylučuje vliv vnějších podmínek na výskyt klíněnky.

Molekulární analýzou mikrosatelitních oblastí u všech testovaných jedinců byla zjištěna vysoká hodnota genetické diverzity, kterou potvrzuje průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu 0,60. V rámci dedrogramu podobnosti došlo ke statisticky průkaznému rozlišení všech studovaných jedinců do pěti sekcí a tří skupin dle jejich rozdílné náchylnosti ke klíněnce. Využití SSR markerů při rozlišování genotypů s rozdílnou úrovní náchylnosti dokazuje zařazení dvou méně náchylných genotypů jírovce maďalu do rezistentní skupiny. Primerovými kombinacemi, použitými v této práci, lze zároveň rozlišit jednotlivé genotypy mezi sebou jak na vnitrodruhové tak i na mezidruhové úrovni. Během genetických analýz byla ověřena i účinnost nového, termostabilního SB pufru, který vlivem nižší koncentrace přebytečných volných iontů projevuje lepší rozlišovací schopnost při SSR analýzách a elektroforetické separaci na polyakrylamidovém gelu. Jednoduchostí přípravy se tento pufr nabízí i jako levnější alternativa k zavedeným TAE a TBE pufrům.

Osekvenováním vnitřních transkribovaných mezerníků byla zjištěna velká variabilita ITS1 oblastí ve srovnání s ITS2. Velká variabilita ITS oblastí u hybridního druhu *A. x carnea* lze vysvětlit pomalou homogenizací vnitřních mezerníků v rámci celého genomu. Rozdílné sekvence klonovaných lokusů dokazují vhodnost klonování pro rozlišení vnitřní variability každého lokusu. Toto tvrzení podporuje identita každého klonu pro genotypy ACAR R/N a získaná sekvence druhu savenky finské, která byla



klonovací strageí detekována. U ostatních klonovaných sekvencí již byla v rámci genotypu zjištěna téměř úplná identita v rámci klonovací reakce. Získané sekvence *A. x carnea* jsou zároveň unikátními sekvencemi, kdy nebyla nalezena žádná shoda pro tento druh v genové databázi NCBI. Pro další fylogenetické studie druhů rodu *Aesculus* bude vhodné sekvenování i chloroplastových oblastí jako jsou *trnH – psbA*, *trnL – trnF* a *matK*, které jsou poměrně variabilní a vhodné pro analýzu blízkých příbuzných druhů. Získané unikátní sekvence v této práci budou uloženy do genové databáze.

## 8 LITERÁRNÍ ZDROJE

Abdallah A. A., Zhang Z.-Q., Masters J. G. & McNeill S., 2001: *Euseius finlandicus* (Acari: Phytoseiidae) as a potential biocontrol agent against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): life history and feeding habits on three different types of food. *Experimental and Applied Acarology*, 25: 833 – 847 s. ISSN 1572-9702

Agarwal M., Shrivastava N. & Padh H., 2008: Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27: 617 – 631 s. ISSN 0721-7714

Aguilar F.J., Rosselló A.J. & Feliner N.G., 1999: Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeraria* (*Plumbaginaceae*). *Molecular Ecology*, 8: 1341 – 1346 s. ISSN 1365-294X

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P., 2008: *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 1392 s. ISBN 0-8153-4105-9

Ambrose D.Ch. & Crease J.T., 2011: Evolution of the nuclear ribosomal DNA intergenic spacer in four species of the *Daphnia pulex* complex. *BioMed Central Genetics*, 12: 14 s. ISSN 1471-2156

AppliChem, 2008: *Biological buffers*. Databáze online [cit. 2015-03-21]. Dostupné na: <https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf>

Arif A.I., Bakir A.M., Khan A.H., Al Farhan H.A., Al Homaidan A.A., Bahkali H.A., Al Sadoon M. & Shobrak M., 2010: A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (5): 2079 – 2096 s. ISSN 1422-0067

ASP, 2008: *Assess 2.0 Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*. Technical manual, The American Phytopathological Society, St. Paul, 125 s.

Ayeh O.K., 2008: Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphism (SNPs): Emerging molecular marker tool for improving traits in plant biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 7(4): 331 – 341 s. ISSN 1684-5315

Aze T., Ezard G.H.T., Purvis A., Coxall K.H., Stewart M.R.D., Wade S.B. & Pearson N.P., 2013: Identifying anagenesis and cladogenesis in the fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32): 1 s. ISSN 1091-6490

Báčovský V., 2013: *Studium genetické diverzity jírovce s rozdílnou rezistencí ke klíněnce jírovcové*. Bakalářská práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně), MENDELU Brno, 63 s.

Blaalid R., Kumar S., Nilson H.R., Abarenkov K., Kirks M.P. & Kauserud H., 2013: ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2): 218 - 224 s. ISSN 1755-0998

Bola G., 2005: Evaluating the role of G,C-nucleotides and length of overhangs in T4 DNA ligase efficiency. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 8: 1 – 7 s.

Broody R.J. & Kern E.S., 2004a: History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 333: 1 – 13 s. ISSN 1096-0309

Broody R.J. & Kern E.S., 2004b: Sodium boric acid: Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*, 36: 214 – 216 s. ISSN 0736-6205

Bzymek M. & Lovett T.S., 2001: Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (15): 8319 – 8325 s. ISSN 1091-6490

Cronn R.C. & Adams K.L., 2003: Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *BioTechniques*, 34(4): 726 – 730 s. ISSN 0736-6205

D'Acunto R.M., Gelfi C., Stoyanov A., Andreec V. & Righetti G.P., 2002: Potential binding of borate ions to mono- a and oligonucleotides: a capillary electrophoresis investigation. *Journal of Chromatography A*, 979: 285 – 297s. ISSN 1873-3778

Federoff V.N., 2012: Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science*, 338 (6108): 758 – 767 s. ISSN 1095-9203

Fermentas, 2006: *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit*. Technical manual, databáze online [cit. 2015-03-31]. Dostupné na: [https://www.cosmobio.co.jp/product/products\\_FER\\_20060307/GeneJETplasmidMiniprepKit1.pdf](https://www.cosmobio.co.jp/product/products_FER_20060307/GeneJETplasmidMiniprepKit1.pdf)

Feynman P.R., Leighton B.R. & Sands M., 2000: *Feynmanovy přednášky z fyziky s řešenými příklady 1/3*. Fragment, Havlíčkův Brod, 732 s. 978-80-7200-405-8

Gansauge M.-T. & Meyer M., 2013: Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. *Nature Protocols*, 8: 737 – 748 s. ISSN 1750-2799

Gilbert M. & Grégoire J.-C., 2003: Visual, semi-quantitative assessments allow accurate estimates of leafminer population densities: an example comparing image processing and visual evaluation of damage by the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella* (Lep., Gracillariidae). *Journal of Applied Entomology*, 127(6): 354 – 359 s. ISSN 0931-2048

Gonzales C.N., Cingolani E.H., Mattiazii R.A., Marsiglia C.J. & Serur R.J., 1971: Mechanism of action of Tris (hydroxymethyl) aminomethan on the negative inotropic effect of carbon dioxide. *Circulation Research*, 28: 74 – 83 s. ISSN 1524-4571

Green R.M. & Sambrook J., 2012: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2028 s. ISBN 978-1-936113-42-2

Harris J.A., 2007: *Molecular and morphological inference of the phylogeny, origin, and evolution of Aesculus L. (Sapindales)*. Dissertation work, North Carolina State University, Raleigh, 128 s.

Hartl L.D., 2012: *Essential genetics: a genomics perspective*. Jones & Bartlett Publishers, 6<sup>th</sup> edition, 572 s. ISBN-13 9781449686888

He M., Huang L., Shi J. & Jinag Y., 2005: Variability of ribosomal DNA ITS-2 and its utility in detecting genetic relatedness of *Pearl oyster*. *Marine Biotechnology*, 15: 40 – 45 s. ISSN 1436-2236

Hillis M.D. & Dixon T.M., 1991: Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66 (4): 411 – 453 s. ISSN 033-5770

Chang Ch. & Ku Y., 1995: The adsorption and desorption characteristics of EDTA-chelated copper ion by activated carbon. *Separation Science and Technology*, 30 (6): 899 – 915 s. ISSN 0149-6395

Chanon M.A., 2005: *Studies on the reproductive capacity of Aesculus parviflora and Aesculus pavia: opportunities for their improvement through interspecific hybridization*. Dissertation work, The Ohio State University, Columbus, 305 s.

Chloupek O., 2008: *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Academia, Praha, 312 s. ISBN 978-80-200-1566-2

Christelová P., 2011: *Analýza genetické diverzity a evoluce genomu banánovníku*. Dizertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc, 190 s.

Irzykowska L., Werner M., Bocianowski J., Karolewski Z. & Frużyńska-Józwiak D., 2013: Genetic variation of horse chestnut and red horse chestnut and trees susceptibility to *Erysiphe flexuosa* and *Cameraria ohridella*. *Biologia*, 68 (5): 851 – 860 s. ISSN 1336-9563

Isagi Y., Saito D., Kawaguchi H., Tateno R. & Watanabe S., 2009: Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *Journal of Ecology*, 95: 983 – 990 s. ISSN 1365-2745

Janq C.C., Chao J.L., Jones N., Yao L.C., Bessarab D.A., Kuo Y.M., Jun S., Desplan C., Beckendorf S.K. & Sun Y.H., 2003: Two pax genes, eye gone and eyeless, act cooperatively in promoting *Drosophila* eye development. *Development*, 130 (13): 2939 – 2951 s. ISSN 1477-9129

Jiang L.G., 2013: *Molecular markers and marker-assisted breeding in plants*, s. 45 – 83. In: Andersen B.S.(ed.), *Plant breeding from laboratories to fields*. InTech, 298 s. ISBN 978-953-51-1090-3

Kelly T.H., Hill E., Reid F., Grant H.M. & MacDonald C., 2000: Comparison of RAP-PCR analysis of gene expression in fresh and immortalised rat hepatocyte cell lines. *Cytotechnology*, 34: 159 – 163 s. ISSN 1573-0778

Konečná E., 2010: *Studium genetické příbuznosti rostlin pomocí molekulárních markerů*. Diplomová práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně), MENDELU Brno, 75 s.

Lai Y. & Sun F., 2003: The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution*, 20 (12): 2123 – 2131 s. ISSN 1537-1719

Laštůvka Z. & Krejčová P., 2000: *Ekologie*. KONVOJ, spol.s.r.o.; Brno, 185 s. ISBN 80-85615-93-2

LeRiche K., Eagle C.H.S. & Crease J., 2014: Copy number of the transposon, *Pokey*, in rDNA is positively correlated with rDNA copy number in *Daphnia obtusa*. *PlosOne*, 9 (12): 21 s. ISSN 1932-6203

Li Ch.Y., Korolo B.A., Fahima T. & Nevo E., 2004: Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 991 –1007 s. ISSN 1537-1719

Li G., McVetty E.B.P. & Quiros F.C., 2013: *SRAP molecular marker technology in plant science*, s. 23 – 43. In: Andersen B.S.(ed.), *Plant breeding from laboratories to fields*. InTech, 298 s. ISBN 978-953-51-1090-3

- Li X., Gao W., Guo H., Zhang X., Fang D.D. & Lin Z., 2014: Development of EST-based SNP and InDel markers and their utilization in tetraploid cotton genetic mapping. *BioMed Central Genomics*, 15: 11 s. ISSN 1471-2164
- Lin P.-Ch., Wu S.-Ch., Huang Y.-Y. & Chaw M.-S., 2012: The complete chloroplast genome of *Ginkgo biloba* reveals the mechanism of inversed repeat contraction. *Genome, Biology and Evolution*, 4 (3): 374 – 381s. ISSN 1759-6653
- Liu Q., Li L., Zhang N., Liu J. & Shi Y., 2010: Development and characterization of chloroplast microsatellite markers in *Pseudoroegneria* and *Leymus* (*Poaceae: Triticeae*). *Journal of Genetics*, 89: 11 - 22 s. ISSN 022-1333
- Mertelík J. & Kloudová K., 2006: *Klon Aesculus hippocastanum Mertelik06 s rezistentním chováním ke Cameraria ohridella*. Databáze online [cit. 2015-03-16]. Dostupné na: [http://www.isvav.cz/resultDetail.do;jsessionid=EA4C20DC890B2AFA09658A9EDB850726?rowId=RIV%2F00027073%3A\\_\\_\\_\\_\\_ %2F06%3A%230000828!RIV11-MZP-00027073](http://www.isvav.cz/resultDetail.do;jsessionid=EA4C20DC890B2AFA09658A9EDB850726?rowId=RIV%2F00027073%3A_____ %2F06%3A%230000828!RIV11-MZP-00027073)
- Mertelík J. & Kloudová K., 2009: Výsledky sledování rezistentních projevů *Aesculus hippocastanum* (klon M06) ve vztahu k infestaci klíněnkou jírovcovou (*Cameraria ohridella*) v období 2001 –2008. *Acta Pruhoniciana*, 93: 11 –14 s. ISSN 0374-5651
- Minami E., Isagi Y., Kaneko Y. & Kawaguchi H., 1998: Polymorphic microsatellite markers in Japanese horse chestnut *Aesculus turbinata* Blume. *Molecular Ecology*, 7: 1613 – 1621. ISSN 1365-294X
- Mishra K.K., Fougat R.S., Ballani A., Vinita T., Yachana Y. & Madhumati B., 2014: Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2 (1): 169 – 188 s. ISSN 2320-7051
- Mondini L., Noorani A. & Pagnotta A.M., 2009: Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1 (19-35): 17 s. ISSN 1424-2818
- Mrkva R., 1999: *Přízrak klíněnky jírovcové obchází Evropou*. In Laštůvka Z. (ed.): *Klíněnka jírovcová*. Veronica 13/2 : 5 – 11 s. ISSN 1213-0699
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 (1): 263 – 273 s. ISSN 0091-7451
- Nejezchlebová M., 2011: *Studium podstaty rezistence rodu Aesculus vůči klíněnce jírovcové (Cameraria ohridella)*. Diplomová práce, Lednice, 89 s.

Němcová P., Hříbová E., Valárik M. & Doležal J., 2010: A complex approach for unravelling *Musaceae* phylogeny molecular level. *Acta Horticulturae* (ISHS), 897: 139 – 142 s. ISSN 0567-7572

Nováková P., 2008: *Bionomie klíněnky jírovcové (Cameraria ohridella) a jejích přirozených nepřátel z řádu blanokřídlých (Hymenoptera: Chalcidoidea); možnosti obrany*. Dizertační práce, Praha, 144 s.

Ondroušková J., 2011: *Studium genetické variability tritikale mikrosatelitními markery*. Diplomová práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně), MENDELU Brno, 63 s.

Paton A., 2009: Biodiversity informatics and the plant conservation baseline. *Trends in Plant Science*, 14 (11): 629 – 637 s. ISSN 1360-1385

Pešková V. & Soukup F., 2009: Skvrnitosti listů houbového původu. *Lesnická Práce (ČTK)*, 11: 3 s. ISSN 0322-9254

Promega, 2010: *pGEM®-T and pGEM®-T easy vector systems*. Technical manual, databáze online [cit. 2015-03-15]. Dostupné na: <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>

Provan J., Soranzo N., Wilson J.N., Goldstein B.D. & Powell W., 1999: A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153: 943 – 947 s. ISSN 1943-2631

Qiagen, 2012a: *DNeasy® Plant Handbook*. Technical manual, databáze online [cit. 2015-03-31]. Dostupné na: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>

Qiagen, 2012b: *QIAquick Spin Handbook*. Technical manual, databáze online [cit. 2015-03-31]. Dostupné na: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=3987caa6-ef28-4abd-927e-d5759d986658&lang=en>

Qureshi N.S., Saha S., Kantety V.R. & Jenkins N.J., 2004: EST-SSR: A new class of genetic markers in cotton. *The Journal of Cotton Science*, 8: 112 – 123 s. ISSN 1524-3303

Rands W.R.M., Adams M.W., Bennun L., Butchart M.H.S, Clements A., Coomes D., Entwistle A., Hodge I., Kapos V., Scharlemann W.P.J., Sutherland J.W. & Vira B., 2010: Biodiversity Conservation: Challenges Beyond 2010. *Science*, 329 (8): 1298 – 1303 s. ISSN 1095-9203

- Reliene R. & Schiestl H.R., 2003: Mouse models for induced genetic instability at endogenous loci. *Oncogene*, 22: 7000 – 7010 s. ISSN 1476-5594
- Ritter E., Ruiz de Galarreta I.J., Hernandez M., Plata G., Barandalla L., Lopez R., Sanchez I. & Gabriel J., 2009: Utilization of SSR and cDNA markers for screening known QTLs for late blight (*Phytophthora infestans*) resistance in potato. *Euphytica*, 170 (1 – 2): 77 – 86 s. ISSN 1573-5060
- Rosenblum B.E., 2006: Convergent evolution and divergent selection: lizards at the white sands ecotone. *The American Naturalist*, 167(1): 1 – 15 s. ISSN 1537-5323
- Russel T., 2005: *Wood*, s. 315 –333. In: Prance G. & Nesbitt M. (eds.), *The cultural history of plants*. Routledge, New York, 452 s. ISBN 0-203-02090-1
- Sanderson A.B., Araki N., Lilley L.J., Guerrero G. & Lewis K.L., 2014: Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 454: 44 – 52 s. ISSN 1096-0309
- Semagn K., Bjørnstad Å. & Ndjiondjop N.M., 2006: An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25): 2540 – 2568 s. ISSN 1684-5315
- Schlötterer Ch. & Tautz D., 1992: Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20 (2): 211 – 215 s. ISSN 1362-4962
- Smith A.S., Beaulieu M.J. & Donoghue J.M., 2009: Mega-phylogeny approach for comparative biology: an alternative to supertree and supermatrix approaches. *BMC Evolutionary Biology*, 9 (37): 12 s. ISSN 1471-2148
- Snustad P.D. & Simmons J.M., 2009: *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2
- Steele H., Laue B.E., MacAskill G.A., Hendry S.J. & Green S., 2010: Analysis of the natural infection of European horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Plant Pathology*, 6: 1005 – 1013 s. ISSN 1365-3059
- Stellwagen C.N., 2009: Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, 30 (1): 188 – 195 s. ISSN 1522-2683
- Stellwagen C.N., Bossi A., Gelfi C. & Righetti G.P., 2000b: DNA and buffers: are there any noninteracting, neutral pH buffers? *Analytical Biochemistry*, 287: 167 – 175 s. ISSN 1097-0282



Stellwagen C.N., Gelfi C. & Righetti G.P., 2000ba: DNA and buffers: the hidden danger of complex formation. *Biopolymers*, 54 (2): 137 – 142 s. ISSN 1097-0282

Storch V., Welsch U. & Wink M., 2013: *Evolutionsbiologie*. Springer Spektrum, Wiesbaden, 570 s. IBSN 978-3-642-32836-7

Stratec Molecular, 2014: *Invisorb Fragment CleanUp User Manual*. Technical manual, databáze online [cit. 2015-03-31]. Dostupné na: [http://www.stratec.com/en/molecular/Products\\_Molecular/DNA\\_fragments/invisorb\\_fragment\\_cleanup/invisorb\\_fragment\\_cleanup.php](http://www.stratec.com/en/molecular/Products_Molecular/DNA_fragments/invisorb_fragment_cleanup/invisorb_fragment_cleanup.php)

Strauss H.S., Bousquet J, Hipkins D.V. & Hong Y.-P., 1992: Biochemical and molecular genetic markers in biosystematic studies of forest trees. *New Forests*, 6: 125 – 158 s. ISSN 1573-5095

Suresh S., Park J.-H., Cho G.-T., Lee H.-S., Baek H.-J., Lee S.-Y. & Chung J.-W., 2013: Development and molecular characterization of 55 novel polymorphic cDNA-SSR markers in faba bean (*Vicia faba* L.) using 454 pyrosequencing. *Molecules*, 18: 1844 – 1856 s. ISSN 1420-3049

Šefrová H., 2002: *Invazní druhy klíněnek v Evropě - biologie, šíření, význam a ochrana hostitelských dřevin (Insecta, Lepidoptera, Gracillariidae)*. Dizertační práce, MZLU v Brně, Brno, 113 s.

Tozlu E. & Demirci E., 2010: First report of powdery mildew of *Aesculus hippocastanum* caused by *Erysiphe flexuosa* in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 5: 61 – 62 s. ISSN 1833-928X

Tóth G., Gáspári Z. & Jurka J., 2000: Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967 –981 s. ISSN 1088-9051

Thomas T.D., Ahedor R.A., Williams F.Ch., dePamphilis C., Crawford J.D. & Xiang Q.Y., 2008: Genetic analysis of a broad hybrid zone in *Aesculus* (*Sapindaceae*): is there evidence of long – distance pollen dispersal? *International Journal of Plant Science*, 169: 647 – 657 s. ISSN 1537-5315

Trandžík P., 2005: *Dynamika početnosti klíněnky jírovcové a její přirození nepřátelé v okolí Piešťan*. Diplomová práce, MZLU v Brně, Lednice, 52 s.

Vignal A., Milan D., SanChristobal M. & Eggen A., 2002: A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution*, 34 (3): 275 – 305 s. ISSN 1297-9686

Vyhnánek T., Bačovský V., Vlašínová H., Havel L., Šedivá J. & Mertelík J., 2013: Studium genetické variability u zástupců rodu *Aesculus* pomocí SSR markerů. *Zprávy lesnického výzkumu*, 58 (3): 244 – 249 s. ISSN 1805-9872

Weber E.R., 1992: Use of ionic and zwitterionic (Tris/BisTris and Hepes) buffers in studies on hemoglobin function. *Journal of Applied Physiology*, 72(4): 1611 – 1615 s. ISSN 1522-1601

White T., Adams W. & Neale D., 2007: *Forest Genetics*. CABI Publishing, Cambridge, 661 s. ISBN-13 978-0851993485

White J.T., Bruns T., Lee S. & Taylor J., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, New York: 315 – 322 s. ISBN-13 978-0123721815

Wu Y.-C., Bansal S.M., Rasmussen D.M., Herrero J. & Kellis M., 2014: Phylogenetic identification and functional characterization of orthologs and paralogs across human, mouse, fly, and worm. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 25 s. ISSN 1943-0264

Xiang Q.-Y., Crawford J.D., Wolfe D.A., Tang Y.-Ch. & DePamphilis W.C., 1998: Origin and biogeography of *Aesculus* L. (*Hippocastanaceae*): a molecular phylogenetic perspective. *Evolution*, 52 (4): 988 – 997 s. ISSN 1558-5646

Yang Y., Yuanye D., Qing L., Jinjian L., Xiwen L. & Yitao W., 2014: Complete chloroplast genome sequence of poisonous and medicinal plant *Datura stramonium*: organizations and implications for genetic engineering. *PlosOne*, 9(11): 14 s. ISSN 1932-6203

Zhang K., Martiny C. A., Reppas B. N., Barry W. K., Malek J., Chisholm W. S. & Church M. G., 2006: Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nature Biotechnology*, (24): 680 – 686 s. ISSN 1087-0156

Zheng Y., Zhang G., Lin F., Wang Z., Jin G., Yang L., Wang Y., Chen X., Xu Z., Zhao X., Wang H., Lu J., Lu G. & Wu W., 2008: Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1340 – 1347 s. ISSN 1096-0937

Zuo P. & Rabie B.M., 2010: One step DNA fragment assembly and circularization for gene cloning. *Current Issues in Molecular Biology*, 12(1): 11 – 16 s. ISSN 1467-3037

## 9 SEZNAM GRAFŮ, OBRÁZKŮ A TABULEK

### 9.1 Seznam grafů

Graf 1 – Poškození listů larvami klíněnky jírovcové v podmínkách umělé infestace

Graf 2 – Poškození listů larvami klíněnky jírovcové za vegetační období 2014;

Graf 3 – Dendrogram podobnosti analyzovaných genotypů jírovce

### 9.2 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Obecné schéma klonování DNA

Obrázek 2 – Obecné znázornění sklouznutí DNA polymerázy během replikace u GAA/CTT mikrosatelitního motivu

Obrázek 3 – Obecné schéma nerovnoměrného crossing overu a genové konverze

Obrázek 4 – Obecné znázornění ribozomální struktury DNA

Obrázek 5 – Chloroplastová mapa genomu durmanu obecného

Obrázek 6 – Obecné schéma pozitivní zpětné vazby elektrokonduktivních medií

Obrázek 7 – Kultivace *E. coli* na pevném LB médiu

Obrázek 8 – Nastavení barevného spektra při hodnocení listové plochy

Obrázek 9a/b – Stupňovité poškození listů jírovců (orig. V. Bačovský)

Obrázek 10 – Atypické minování na listech genotypu *A. hippocastanum* A27

Obrázek 11 – Polyakrylamidový gel; SSR marker AT3D6

Obrázek 12 – Srovnání úspěšnosti TBE a SB pufru během elektroforetické separace

Obrázek 13 – Separované produkty po PCR z genomické DNA

Obrázek 14 – Amplikony PCR po klonování DNA v kulturách *E. coli*

Obrázek 15 - Příklad špatně čitelné sekvence genotypu A30

Obrázek 16 – Polymorfni sekvence hybridního druhu *A. x carnea*

Obrázek 17 – Srovnání sekvencí ITS1 a vybraných klonů

Obrázek 18 – Srovnání sekvencí ITS2 a vybraných klonů

### 9.3 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Náchylnost a tolerance vybraných druhů ke stresovým faktorům

Tabulka 2 – Anatomická a morfologická charakteristika vybraných jedinců rodu *Aesculus*

Tabulka 3a/b – Přehled rostlinného materiálu pro diplomovou práci

Tabulka 4 – Sekvence primerů pro nrDNA

Tabulka 5 – Složení PCR reakce pro ITS oblasti

Tabulka 6 – profil PCR pro primery ITS5 a ITS4

Tabulka 7 – Složení reakční směsi ligace

Tabulka 8 – Seznam použitých chemikálií při transformaci

Tabulka 9 – Složení PCR pro testování transformace

Tabulka 10 – Teplotní profil PCR pro primery SP6 a T7

Tabulka 11 – Složení médií TBE a SB pufry

Tabulka 12 – Přehled hodnocení rezistence u vybraných jedinců

Tabulka 13 – Stupnice poškození jírovců larvami k. jírovcové

Tabulka 14 – Heterozygotní konstituce u analyzovaných jedinců

Tabulka 15 – Vyhodnocení jednotlivých SSR markerů společně s výčtem heterozygotů na každý lokus

Tabulka 16 a/b – Výstup srovnání sekvencí v databázi NBCI vyhledávacím algoritmem BLAST