

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



Rod Lophophora J. M. Coult.
II. Fylogeneze rodu a molekulární charakterizace druhů

Bc. Barbora Sasáková

Diplomová práce
Studijní obor: Botanika
Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Ľuboš Majeský, Ph.D.

Olomouc 2018

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Vojtěchu Myšákovi, Jaroslavu Bohatovi a Jaroslavu Šnicerovi za pomoc s taxonomickou validací vzorků a přínosné poznatky o rodě *Lophophora*. Dále také Ing. Markétě Dobré za pomoc při tvorbě mapových výstupů a v neposlední řadě vedoucímu mé práce RNDr. Ľuboši Majeskému, Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři a při psaní práce. Tuto práci bych ráda věnovala *in memoriam* Ing. Rudolfu Grymovi, který byl významným odborníkem na rod *Lophophora*, jehož dvě monografie zabývající se rodem jsou velice přínosné a poměrná část mé práce vychází právě z nich.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Barbora Sasáková

Název práce: Rod *Lophophora* J. M. Coult.

II. Fylogeneze rodu a molekulární charakterizace druhů

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci, Česká republika

Vedoucí práce: RNDr. Ľuboš Majeský Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt

Rod *Lophophora* je druhově nepočetný rod nenápadných kulovitých bezostných kaktusů s areálem sahajícím od jižního Texasu (USA) až po stát Querétaro (Mexiko). V současné době se rod dělí na dvě sekce. V sekci *Diffusae* se rozlišují čtyři druhy *L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*. Do sekce *Lophophora* se řadí jeden polymorfní druh *L. williamsii*. Takovéto systematické členění rodu je ale povětšinou ignorováno odbornou veřejností a v odborné literatuře se lze setkat s názory, že rod obsahuje jenom dva druhy, jižní typ – *L. diffusa* a severní typ – *L. williamsii*. Z důvodů nejasného rozlišení a pojetí taxonů v rámci rodu jsem se v mé diplomové práci zabývala touto problematikou z pohledu molekulární biosystematiky. Cílem práce bylo najít polymorfní genetické markery a aplikovat je na studium vymezení druhů a genetické variability 208 jedinců rodu *Lophophora*. Původ poskytnutých vzorků rovnoměrně pokrýval areál rozšíření rodu a širokou škálu rozeznávaných morfologických a růstových forem. Po předběžné selekci genetických markerů byl vybrán jeden úsek jaderné (ITS) a dva úseky chloroplastové DNA (*trnT-trnL*, *trnL-trnF*). Po spojení identifikovaných haplotypových a ribotypových linií bylo celkově rozeznáno deset genetických linií. Čtyři linie byly charakteristické pro taxony *L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*. Zbylých šest linií bylo pozorováno pro vzorky taxonu *L. williamsii*. I přes nízkou variabilitu vybraných molekulárních markerů a skutečnost, že zkoumané taxony jsou si velice blízce příbuzné, výsledky sekvenování jednoznačně podporují rozlišení taxonů *L. diffusa*, *L. koehresii* a *L. alberto-vojtechii* jako samostatných druhů. *Lophophora fricii* je pravděpodobně hybridogenní taxon mezi rodičovskými druhy *L. alberto-vojtechii*[♀] a *L. williamsii*[♂]. *Lophophora williamsii* je druh vysoce polymorfní tvořen vícero genetickými liniemi.

Klíčová slova: DNA, chloroplastový marker, genetická linie, haplotyp, jaderný marker, *Lophophora*, ribotyp, sekvence

Počet stran/počet příloh: 38/7

Jazyk: český

Bibliographic identification:**Author's first name and surname:** Bc. Barbora Sasáková**Title of thesis:** Genus *Lophophora* J. M. Coult. II. Phylogeny and molecular characterization of the species**Type of thesis:** Master thesis**Department:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc**Supervisor:** RNDr. Ľuboš Majeský Ph.D.**The year of presentation:** 2018**Abstract**

The genus *Lophophora* represents a species-poor genus of small inconspicuous globular cacti without spines with distribution area reaching from South Texas (USA) to Querétaro (Mexico). Currently, the genus is divided into two sections *Diffusae* and *Lophophora*. Within the section *Diffusae*, following four species are recognized *L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*. To the section *Lophophora* only one polymorphic species *L. williamsii* is ranked. However, this subgeneric division is mostly ignored by professional botanists and in scientific literature opposite opinion on the systematics of the genus can be found, which is the genus consists of only two species, southern type – *L. diffusa* and northern type – *L. williamsii*. Because of unclear species boundaries and species concept I used methods of molecular biology to shed more light on the biosystematics of the genus *Lophophora*. The aim of my thesis was to find polymorphic genetic markers suitable for the study of species boundaries and the genetic variability of 208 individuals of the genus *Lophophora*. Origin of the provided samples evenly covered the whole distribution area of the genus as well as the wide scale of recognized morphological and growth forms. Finally, after selection of genetic markers, one nuclear locus (ITS) and two chloroplast loci (trnT-trnL, trnL-trnF) were chose. Altogether, ten genetics lineages were recognized, from which four were specific for taxa *L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*, while the remaining six lineages were observed for the taxon *L. williamsii*. Despite the low variability of selected molecular markers and the fact that the investigated taxa are very closely related, the results clearly support distinguishing of *L. diffusa*, *L. koehresii*, and *L. alberto-vojtechii* as distinct species. *Lophophora fricii* is probably a hybridogenous taxon, and parental species being *L. alberto-vojtechii*[♀] and *L. williamsii*[♂]. *Lophophora williamsii* is high polymorphic species represented by several related genetic lineages.

Keywords: DNA, chloroplast marker, genetic lineage, haplotype, *Lophophora*, nuclear marker, ribotype, sequence**Number of pages/appendices:** 38/7**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Luboše Majeského, Ph.D. a s použitím citovaných pramenů.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Obsah

1. Materiál a metody	13
1.1. Rostlinný materiál.....	13
1.2. Izolace DNA.....	13
1.3. Amplifikace vybraných oblastí jaderné a chloroplastové DNA.....	13
1.3.1. PCR reakce.....	14
1.3.2. Čištění PCR produktů před sekvenováním	15
1.4. Analýza dat	15
2. Výsledky	16
3. Diskuze	24
4. Závěr	30
Seznam použité literatury	32
Seznam použitých zkratk.....	37
5. Přílohy.....	38

Seznam obrázků

Obrázek 1: Výsledný alignment sekvenovaného jaderného lokusu ITS.....	18
Obrázek 2: Výsledný alignment dvou sekvenovaných chloroplastových lokusů trnT-trnL a trnL-trnF.....	18
Obrázek 3: Spojený alignment sekvenovaného jaderného markeru ITS a dvou chloroplastových markerů trnT-trnL a trnL-trnF.....	18
Obrázek 4: Parsimonická síť zobrazující nejpravděpodobnější vztahy mezi identifikovanými ribotypy (liniemi) ITS_1 až ITS_6.....	19
Obrázek 5: Parsimonická síť zobrazující nejpravděpodobnější vztahy mezi identifikovanými haplotypy (liniemi) Hap_1 až Hap_6.....	19
Obrázek 6: Parsimonická síť zobrazující nejpravděpodobnější vztahy mezi spojenými sekvencemi identifikovaných ribotypů a haplotypů CON_1 až CON_10.....	20
Obrázek 7: Mapa zobrazující geografickou distribuci identifikovaných ribotypů (linií) ITS_1 až ITS_6 v oblastech Texasu (USA) a Mexika.....	21
Obrázek 8: Mapa zobrazující geografickou distribuci identifikovaných haplotypů (linií) Hap_1 až Hap_6 v oblastech Texasu (USA) a Mexika.....	22
Obrázek 9: Mapa zobrazující geografickou distribuci spojených sekvencí identifikovaných ribotypů a haplotypů CON_1 až CON_10 v oblastech Texasu (USA) a Mexika.....	23

Seznam příloh

Tabulka 1: Použitý rostlinný materiál	38
Tabulka 2: Teploty nasedání primerů (annealing temperature T_a)	41

Úvod

Rod *Lophophora* J. M. Coult. česky ježunka, je málo početná skupina bezostných, zploštěle kulovitých kaktusů. Barva epidermis je zelená, modrozelená, žlutá či načervenalá. Tělo rostlin je rozděleno podélnými žebry na segmenty v maximálním počtu 21. Jedinci mají dlouhý řepovitý kořen tvořící větší část rostliny. Rostou jednotlivě nebo je více nepohlavně vzniklých hlav spojeno jedním kořenem. Dospělá rostlina nemá trny. Namísto nich má na vrcholcích areol světlé chomáče chlupů – trichomy. Květy rostou přes tyhle trichomy a tvoří se v blízkosti temene rostliny. Barva květů může být růžová, fialová, bílá, nažloutlá, nazelenalá nebo načervenalá, závisí na mnoha faktorech, a proto ji neleze použít k determinaci druhu. Areál rodu se rozkládá od jihozápadu Spojených států amerických (státy Texas a Nové Mexiko) přes severní Mexiko až po státy San Luis Potosí a Querétaro (Mexiko). Rostliny rostou v nadmořské výšce od 50 m n. m. do 1800 m n. m. Dnes je nejuznávanější rozdělení rodu na pět samostatných taxonů: *Lophophora williamsii* (Lemaire ex Salm-Dyck) J.M.Coult, *L. diffusa* (Croizat) Bravo, *L. koehresii* (J. Říha) Bohata, Myšák et. Šnicer, *L. fricii* Haberm., *L. alberto-vojtechii* Bohata, Myšák et Šnicer, ale značná plasticita v morfologických znacích, variabilita růstových forem a odlišné nahlížení na tyto charakteristiky odborníkům neulehčuje jednotný názor na taxonomické pojetí rodu (Anderson 1969; Bohata a kol. 2005; Rowley 2006). V úvahu připadá i názor, že rod je monotypický s jedním polymorfním druhem *L. williamsii*, přičemž některým výrazným morfologickým varietám je přisuzován status samostatných druhů (Grym 2014). V roce 2005 byla ve speciální příloze časopisu Kaktusy poprvé uveřejněna ucelená monografie rodu *Lophophora*. Autoři monografie rozdělili rod na dvě sekce. Sekci *Lophophora* s jediným druhem *L. williamsii* a sekci *Diffusae* obsahující tři druhy *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*. Rozdělení do dvou sekcí je obhajováno výraznými rozdíly mezi taxony hlavně v obsahu alkaloidů, ale i areálem výskytu, tvarem a počtem žeber, barvou a tloušťkou epidermis atd. (Bohata a kol. 2005). O pár let později byl stejnými autory popsán druh *L. alberto-vojtechii* řadící se do sekce *Diffusae* (Bohata a kol. 2008).

Rod *Lophophora* ustanovil americký botanik J. M. Coulter v roce 1894 (Coulter 1894). Coulterovo pojmenování pochází z řeckých slov [*laphos*] a [*phero*], což v doslovném překladu znamená „nosit chochol“. Než byla ježunka zařazena do samostatného rodu, byla řazena například do rodu *Echinocactus* Link & Otto, kam

zprvu spadaly všechny kulovité kaktusy (Salm-Dyck 1844). Svým kulovitým vzhledem, nízkým vzrůstem, solitérním i skupinovým růstem a velice podobnými květy mohla připomínat zástupce rodu *Mammillaria* (Coulter 1891). Dále byla řazena do rodu *Anhalonium* Lemaire (Engelmann 1859) a díky své bezostnosti také do rodu *Ariocarpus* Scheidweiler (Voss 1896). Tím problematika zařazení tohoto kaktusu nekončí. Nebylo výjimkou, že byla rostlina během dvou let čtyřikrát přejmenována. (Grym 2014).

Tento rod není znám jenom botanikům a pěstitelům kaktusů, ale i širší laické společnosti. Důvodem je přítomnost alkaloidu meskalinu, látky se silnými psychoaktivními účinky. Meskalin je v největším množství zastoupen jenom u druhu *Lophophora williamsii*. Název tento alkaloid dostal podle severoamerického indiánského etnika Apačů z kmene Meskaleros. Zmíněný alkaloid byl izolován právě z rostlin získaných od tohoto kmene (Heffter 1898). Psychoaktivní účinky *L. williamsii* jsou pravděpodobně známy již více než pět a půl tisíce let (Terry a kol. 2006). Původní obyvatelé Severoamerického kontinentu považovali a dodnes tuto rostlinu považují za všelék a věří, že pomocí ní dokáží navázat kontakt s bohy. To je hlavním důvodem proč na sebe v minulosti poutal a stále poutá, tenhle jinak dosti nenápadný kaktus, tak velkou pozornost. Dalším významným alkaloidem přítomným v rostlinách je pellotin. Ten byl počátkem 20. století užíván jako sedativum a byl izolován z extraktu druhu *Lophophora diffusa*. S příchodem barbiturátů v roce 1911, jejichž výroba byla méně nákladná, pellotin zmizel z farmaceutického trhu (Perrine 2001). Další informace o botanické charakteristice, taxonomii rodu a etnobotanice rodu *Lophophora* jsou uveřejněny v mé bakalářské práci (Sasáková 2015).

Z důvodů nejasného rozlišení a pojetí taxonů v rámci rodu je významné se touto problematikou zabývat z pohledu molekulární biosystematiky. Pro zjištění fylogenetických vztahů mezi taxony a vnitrodruhové struktury taxonu *L. williamsii* pomocí metod molekulární biologie je důležité najít úseky DNA (kódující úseky – geny; nekódující úseky – mezigenové mezerníky), ve kterých se studované vzorky liší. U rostlin se DNA nachází ve třech buňkových organelách: v buňkovém jádře (ncDNA), v chloroplastech (cpDNA) a mitochondriích (mtDNA). Kvůli odlišnému typu dědění jednotlivých organel se informační hodnota DNA organel liší. Jaderná DNA se dědí biparentálně, chloroplastová a mitochondriální uniparentálně, a to u většiny krytosemenných rostlin po mateřské linii, teda matrilineárně. Na základě literární rešerše bylo vybráno vícero lokusů (části genů a mezigenových úseků) z cpDNA a ncDNA pro testování možnosti jejich použití pro biosystematickou studii rodu

Lophophora. Vybrané úseky DNA byly amplifikovány pomocí metody polymerázové řetězové reakce (dále jen PCR) a v případě úspěšné amplifikace byly produkty PCR reakce sekvenovány. Pro tuhle studii byl vybrán jeden úsek jaderné DNA a dva úseky chloroplastové DNA, které byly v konečné fázi spojeny a hodnoceny společně.

Cílem práce tedy bylo vybrat dostatečně polymorfní genetické markery a pomocí nich analyzovat vzorky rostlin rodu *Lophophora*. Následně z výsledků zhodnotit postavení a vymezení jednotlivých taxonů v rodě *Lophophora*.

Cíle práce

Cílem této práce bylo otestovat a vybrat vhodné, dostatečně polymorfní genetické markery pro biosystematickou studii rodu. Použít zvolené markery k analýze 208 vzorků rodu *Lophophora*. Ze získaných výsledků následně zhodnotit postavení a vymezení taxonů v rámci rodu *Lophophora*.

1. Materiál a metody

1.1. Rostlinný materiál

Vzorky pro tuto práci pocházely z různých soukromých sbírek a představovaly rostliny vypěstované ze semen sbíraných před rokem 1996. Taxonomické určení vzorků bylo ověřeno odborníky pro rod *Lophophora*. Celkem jsem měla k dispozici 241 rostlinných vzorků rodu *Lophophora* zahrnujících 7 taxonů a to: 174 vzorků *L. williamsii* (WILL), 16 vzorků *L. diffusa* (DIF), 8 vzorků *L. fricii* (FRI), 11 vzorků *L. koehresii* (KOE), 26 vzorků *L. alberto-vojtechii* (ALV), 3 vzorky *L. jourdaniana* Haberm. (JOU), 3 vzorky *L. williamsii* var. *caespitosa* Y.Ito (CAE). Rostlinný materiál použitý k extrakci DNA představovaly odřezky nadzemních částí rostlin, které byly označeny ID číslem, uloženy do uzavíratelného pytlíčku a uchovávaný při teplotě – 80°C. Seznam použitých rostlin je uvedený v Tabulce 1.

1.2. Izolace DNA

Ne všechny rostlinné druhy představují jednoduchý materiál pro izolaci DNA a kaktusy patří mezi ty obtížnější (Jobes a kol. 1995, Sánchez-Hernández a Gaytán-Oyarzún 2006). Izolace DNA byla proto prováděna náročnější metodou za účelem dosažení co největší čistoty DNA bez příměsí sekundárních metabolitů, zejména polysacharidů.

Genomická DNA byla vyextrahována celkem z 208 vzorků, tedy ne ze všech vzorků nám poskytnutých díky částečné duplikaci, a to hlavně u vzorků taxonu *L. williamsii*. Na extrakci bylo použito mražené nebo sušené rostlinné pletivo. Extrakce byla prováděna podle upraveného sorbitol-CTAB protokolu kvůli odstranění co největšího množství polysacharidů. Celý protokol extrakce je uveden v mé bakalářské práci (Sasáková 2015). Koncentrace vyextrahované DNA byla změřena pomocí spektrometru (NanoDrop 2000, USA), kvalita a integrita genomické DNA byla navíc ověřena pomocí agarózové elektroforézy (Thermo Scientific, USA).

1.3. Amplifikace vybraných oblastí jaderné a chloroplastové DNA

Cílem testování vybraných lokusů bylo zvolit dostatečně polymorfní genetické markery, které by umožnily studování výše zmíněných vztahů. Vyizolovaná DNA byla naředěna na koncentraci přibližně 10 ng/μl a byla použita na testování vybraných lokusů

chloroplastové (cp) a jaderné (nc) DNA pomocí PCR reakce. Z jaderných markerů (ncDNA) byly testovány úseky: ITS (**I**nternal **T**ranscribed **S**pacer), topo6 (podjednotka topoisomerasy), ppc, nhx1, isi. Z chloroplastových markerů (cpDNA) byly vybrány k testování lokusy: matK, trnT-trnL, trnL-trnF, trnS-trnG, trnC-trnD, psbA-trnH, rpL16, rpS16, ycf1.

1.3.1. PCR reakce

Premix použitý pro PCR reakci obsahoval 20-40 ng templátové DNA, 0,4 μ M přímého a zpětného primeru (Tab. 2), 1X KapaTaq pufr, (obsahující 1,5 mM $MgCl_2$), 0,2 mM dNTPs, 1U KapaTaq polymerázy (Kapabiosystems, Boston, USA) a 18,8 μ l sterilní destilované vody doplněné do výsledného objemu 25 μ l. Jednotlivé kroky PCR reakce byly nastaveny následovně: počáteční denaturace při 95°C/3 min následovaná 36 cykly zahrnujících: denuraci při 95°C/30 s, nasedání primerů (annealing*), prodlužování (elongation) při 72°C/30 s; následováno finálním prodloužením (final elongation) při 72°C/10 min. PCR program pro jednotlivé úseky se lišil v annealingové teplotě* (T_a), jejíž hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 2. PCR reakce probíhala v termálním cycleru (Eppendorf, Německo).

1.3.2. Čištění PCR produktů před sekvenováním

Před samotnou sekvenací byly vzorky pročištěny precipitací pomocí 20 % polyethylenglykolu a tím zbaveny pozůstatků nespotřebovaných primerů a nukleotidů. Postup byl následovný. K PCR produktu jsem přidala stejný objem PEG roztoku (20 % PEG 6000, 2,5M NaCl = 14,6 g/100 ml) a nasáváním pipetou vzorky promíchala. Poté je nechala hodinu precipitovat při pokojové teplotě a následně centrifugovala (25 minut při 3700 otáčkách). Supernatant jsem odpipetovala a produkty promyla 40 μ l 70 % EtOH. Opět centrifugovala 15 minut při 3700 otáčkách. Nakonec jsem odpipetovala supernatant, vysrážený pelet jsem vysušila ve vakuové sušičce a rozpustila v destilované vodě. Takto pročištěné vzorky byly uchovávány při teplotě -20°C až do dalšího zpracování. Před samotnou sekvenací jsem smíchala 5 μ l vzorku s 5 μ l sekvenačního primeru (Tab. 2). Tímto způsobem připravené vzorky byly odeslány na sekvenaci, která byla prováděna komerčně u firmy Macrogen (Macrogen, Jižní Korea).

1.4. Analýza dat

Získané sekvence byly upraveny ořezáním nečitelných částí a následně byly homologní úseky zarovnané pod sebe do alignmentu pomocí programu Geneious 7.1.8 (Kearse et al. 2012). Sekvence chloroplastových lokusů *trnT-trnL* a *trnL-trnF* byly spojeny a hodnoceny jako jeden celek. Ve výsledném alignmentu byly určeny variabilní pozice. Odlišné linie (haplotypy/ribotypy) byly identifikovány pomocí webového nástroje FaBox (Villesen 2007), použitím modulu "DNA to haplotype collapse and converter". Pro určení celkové variability a počtu odlišných genetických linií přítomných v rodě *Lophophora*, byly haplotypy spojeny s příslušnými ribotypy (spojení se dělalo pro všechny analyzované vzorky). Odlišné genetické linie byly následně identifikovány pomocí FaBox-u.

Pro velice nízkou variabilitu použitých markerů a malý počet identifikovaných linií nebylo možné na zkoumaném datasetu provést fylogenetickou analýzu. Vztahy mezi odlišnými liniemi byly proto zkoumány prostřednictvím sítí získaných metodou statistické parsimonie za použití statistického balíčku '*haplotypes*' (Aktas 2015) v programu R (R Core Team 2017).

Zjištěné linie byly vyobrazeny pomocí mapových výstupů vytvořených v programu QGIS 2.18.9 (QGIS Team 2013).

2. Výsledky

Po ověření kvality a integrity DNA pomocí agarózové elektroforézy se dá říct, že izolace čisté DNA nebyla u všech vzorků zcela úspěšná. I přes značnou snahu se nepovedlo vyextrahovat dostatečně kvalitní nefragmentovanou DNA zbavenou všech sekundárních metabolitů. To způsobovalo potíže při následné PCR reakci. Zředěním DNA destilovanou vodou na přibližnou koncentraci 10 ng/μl se docílilo i zředění koprecipitátů a inhibitorů PCR reakce. Jen u malé části vzorků se podařilo vyizolovat nefragmentovanou DNA, u ostatních vzorků pozorujeme fragmentovanou DNA nebo DNA s velkým množstvím koprecipitujících polysacharidů, které ji obalují, což se projevilo horším rozpouštěním DNA ve vodě a zvýšenou viskozitou vzorku. Extrakce DNA byla průběžně opakována a protokol byl modifikován, ale bez výraznějšího zlepšení kvality vyextrahované DNA.

Z testovaných jaderných lokusů byl jako jediný použitelný vyhodnocen úsek ITS, který se povedlo amplifikovat u většiny vzorků. U dalších testovaných jaderných markerů (topo6, ppc, nhx1, isi) byla PCR reakce nespecifická a docházelo k amplifikaci více lokusů. Výsledkem byly směsné sekvence, které se nedaly interpretovat. Možnost jejich dalšího použití závisí na optimalizaci podmínek PCR.

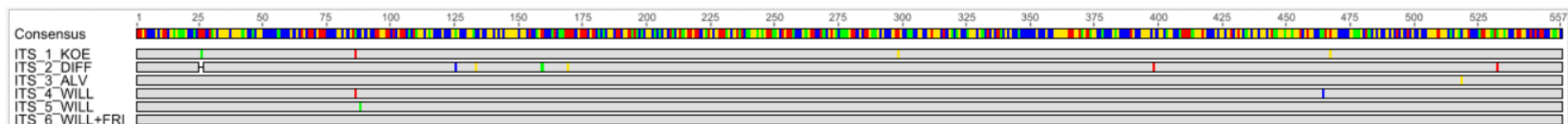
K amplifikaci oblastí chloroplastové DNA bylo pro testování vybráno více lokusů, jejichž výčet je uveden v metodické části. Úsek genu *matK* se podařilo úspěšně amplifikovat, ale po osekvenování úsek nevykazoval žádnou variabilitu mezi testovanými vzorky. U zbývajících lokusů by bylo zapotřebí optimalizovat PCR, aby se daly použít na ne zcela kvalitní DNA. Úseky *trnT-trnL*, *trnL-trnF* se povedlo amplifikovat téměř u všech vzorků bez větších problémů. I přes nízkou míru polymorfizmu byly sekvence použity v následujících analýzách.

Sekvenováním jaderného lokusu ITS jsem rozlišila šest skupin tzv. ITS ribotypů (linií), (Tab. 1, Obr. 1, Obr. 7). Linie ITS_1 byla specifická pro taxon *L. koehresii*, linie ITS_2 byla jedinečná pro taxon *L. diffusa*, a skupina ITS_3 pro taxon *L. alberto-vojtechii*. Do skupiny ITS_4 spadají všechny vzorky taxonu *L. williamsii* var. *caespitosa* a také všechny vzorky taxonu *L. jourdaniana*. Převážná část této linie však byla tvořena jedinci taxonu *L. williamsii*. Skupina ITS_5 byla tvořena pouze vzorky taxonu *L. williamsii* a je druhým nejpočetnějším typem zaznamenaným u tohoto taxonu. Poslední linii ITS_6 tvořily taxony *L. fricii* a *L. williamsii*. Jedná se o celkově nejpočetnější skupinu se zastoupením nejvíce jedinců taxonu *L. williamsii*. Síť (Obr. 4)

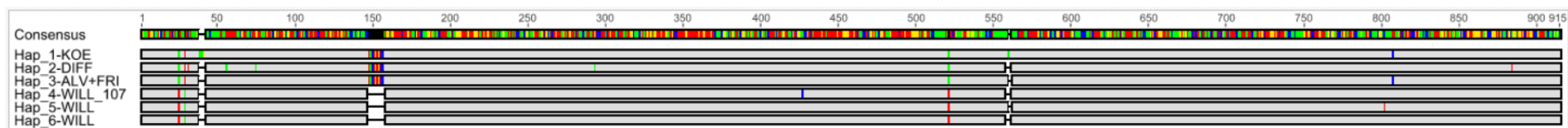
naznačuje možnost vztahů mezi ribotypy. Ribotypy ITS_1 a ITS_2 stojí samostatně a tvoří samostatné vývojové linie. Jsou to linie jednoznačně geneticky odlišitelné a navzájem jsou si nejméně příbuzné. Uprostřed sítě, mezi liniemi ITS_1 a ITS_2, stojí nejpočetnější skupina ITS_6 a jí blízce příbuzné linie ITS_5 a ITS_3. Tyto skupiny jsou si spolu více geneticky podobné a příbuzné, než jsou si podobné a příbuzné s výše popsanými liniemi ITS_1 a ITS_2. Ribotypy ITS_3 a ITS_5 jsou zjevně odvozeny od ribotypu ITS_6. Linie ITS_4 stojí mezi ITS_1 a ostatními genetickými liniemi.

Sekvenováním a následným spojením sekvencí dvou chloroplastových lokusů trnT-trnL a trnL-trnF jsem rozlišila šest skupin tzv. haplotypů (linií), (Tab. 1, Obr. 2, Obr. 8). První linie Hap_1 byla jedinečná pro taxon *L. koehresii*. Haplotyp Hap_2 byl specifický pro taxon *L. diffusa*. Haplotyp Hap_3 byl pozorován u dvou taxonů *L. alberto-vojtechii* a *L. fricii*. Linie Hap_4 byla pozorována pouze u jednoho jediného jedince taxonu *L. williamsii* (WILL_107). Linie Hap_5 byla charakteristická pro část vzorků taxonu *L. williamsii*. Nejpočetnější skupinou byla linie Hap_6, kterou sdílí taxony *L. williamsii* var. *caespitosa*, *L. jourdaniana* a *L. williamsii* (nejpočetnější zastoupení). Síť vytvořená ze spojených chloroplastových lokusů (Obr. 5) ukazuje na jednoznačné odlišení skupin haplotypů Hap_2 – Hap_1+Hap_3 – Hap_4+Hap_5+Hap_6.

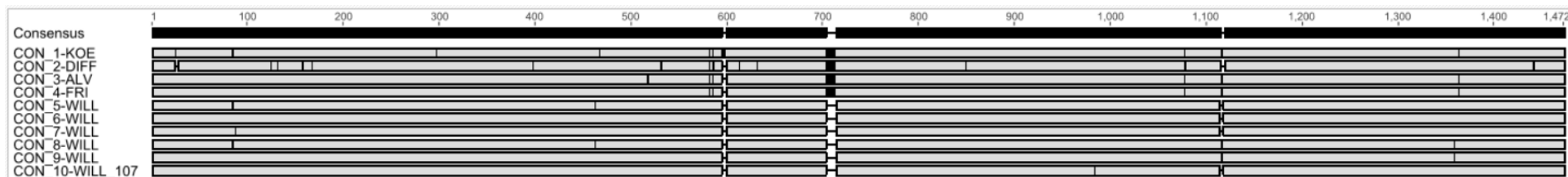
Spojením sekvenovaného jaderného a chloroplastových lokusů vzniklo deset genetických linií (označených jako CON_1 až CON_10; Tab. 1, Obr. 3, Obr. 9). Linie CON_1 byla specifická pro všechny vzorky taxonu *L. koehresii*, linie CON_2 pro taxon *L. diffusa*, CON_3 pro taxon *L. alberto-vojtechii*, CON_4 pro taxon *L. fricii*. Linie CON_5 zahrnuje taxony *L. williamsii* var. *caespitosa*, *L. jourdaniana* a *L. williamsii* a je to druhá nejpočetnější skupina. Linie CON_6 byla nejpočetnější linií a je specifická pro taxon *L. williamsii*. Zbývající linie CON_7, CON_8, CON_9, CON_10 jsou méně početné a byly pozorovány jenom u jedinců taxonu *L. williamsii*. Rozdíly mezi jednotlivými liniemi byly velmi malé (Obr. 3). Parsimonická síť (Obr. 6) vytvořená ze spojených sekvencí naznačila existenci tří hlavních skupin: *L. koehresii* (CON_1), *L. diffusa* (CON_2) a *L. williamsii* (CON_5, CON_6, CON_7, CON_8, CON_9, CON_10). Linie CON_3 (*L. alberto-vojtechii*) a CON_4 (*L. fricii*) tvoří přechod mezi výše zmíněnými třemi skupinami.



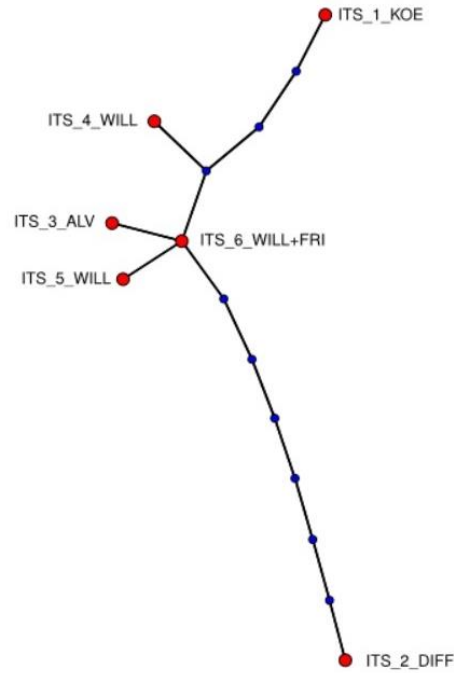
Obrázek 1: Výsledný alignment sekvenovaného jaderného lokusu ITS. Zobrazeny jsou pouze odlišné sekvence identifikovaných ribotypů (linií) ITS_1 až ITS_6. Seznam vzorků patřící k příslušným ribotypům je uveden v Tabulce 1. Čísla v konsenzuální sekvenci představují pořadí nukleotidů ve výsledném alignmentu a barvy představují jednotlivé nukleotidy (zelená=T, červená=A, modrá=C, žlutá=G), prázdné místo v alignmentu se označuje jako „gap“ – pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích a šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální. Barevné „čárky“ v jednotlivých sekvencích označují variabilní pozice, kterými se jednotlivé ribotypy od sebe liší a barva reprezentuje odlišný nukleotid přítomný v dané sekvenci v dané pozici.



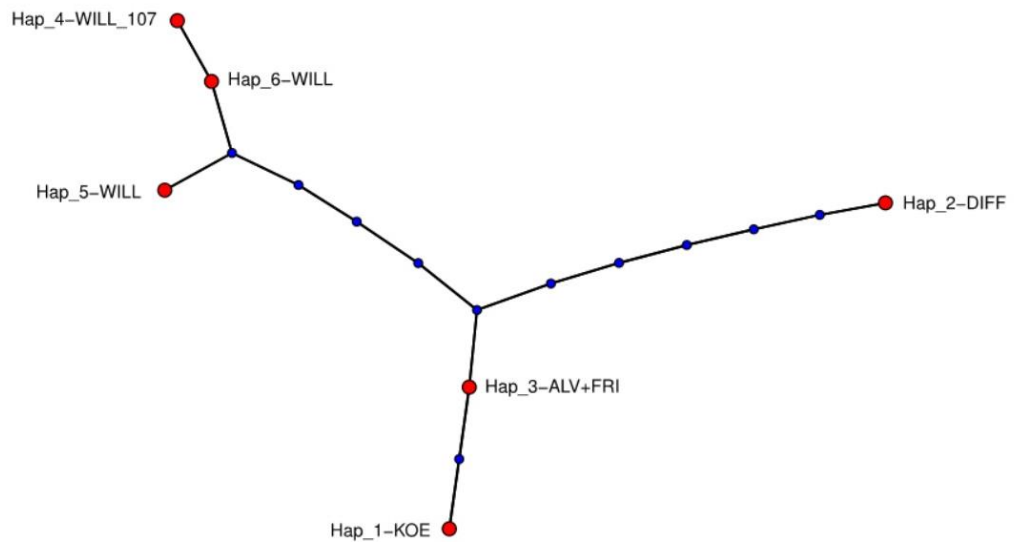
Obrázek 2: Výsledný alignment dvou sekvenovaných chloroplastových lokusů trnT-trnL a trnL-trnF. Zobrazeny jsou pouze odlišné sekvence identifikovaných haplotypů (linií) Hap_1 až Hap_6. Seznam vzorků patřící k příslušným haplotypům je uveden v Tabulce 1. Čísla v konsenzuální sekvenci představují pořadí nukleotidů ve výsledném alignmentu a barvy představují jednotlivé nukleotidy (zelená=T, červená=A, modrá=C, žlutá=G), prázdné místo v alignmentu se označuje jako „gap“ – pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích a šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální. Barevné „čárky“ v jednotlivých sekvencích označují variabilní pozice, kterými se jednotlivé haplotypy od sebe liší a barva reprezentuje odlišný nukleotid přítomný v dané sekvenci v dané pozici.



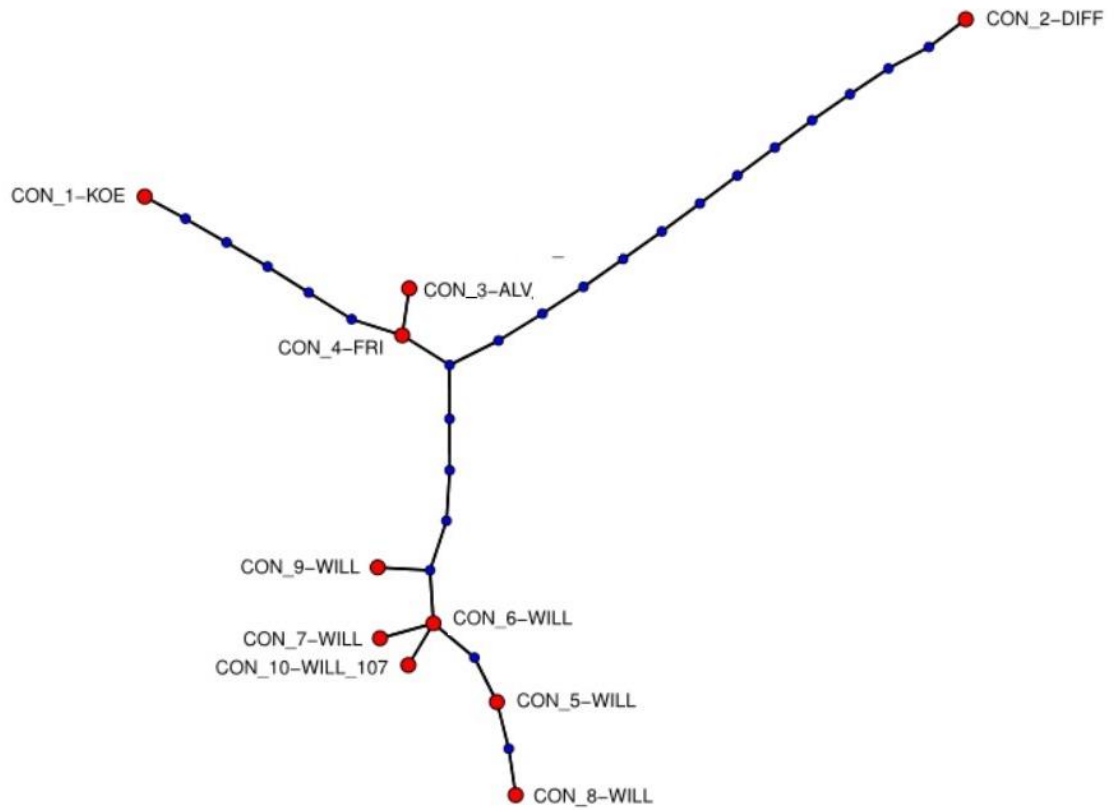
Obrázek 3: Spojený alignment sekvenovaného jaderného markeru ITS a dvou chloroplastových markerů trnT-trnL a trnL-trnF. Zobrazeny jsou pouze odlišné sekvence identifikovaných genetických linií CON_1 až CON_10. Seznam vzorků patřící k příslušným haplotypům je uveden v Tabulce 1. Čísla v konsenzuální sekvenci představují pořadí nukleotidů ve výsledném alignmentu. Prázdné místo v alignmentu se označuje jako „gap“ – pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích a šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální. Svislé „čárky“ v jednotlivých sekvencích označují variabilní pozice, kterými se od sebe jednotlivé genetické linie liší a černé „čtverečky“ označují místo, ve kterém je daný úsek přítomný oproti „gapu“ v ostatních sekvencích.



Obrázek 4: Parsimonická síť zobrazující nejpravděpodobnější vztahy mezi identifikovanými ribotypy (liniemi) ITS_1 až ITS_6. Červeným kruhem je označena pozice ribotypu s jeho označením a označením příslušného taxonu, pro který byla daná linie pozorována. Seznam vzorků patřících k jednotlivým liniím je v Tabulce 1. Menší modré kruhy označují hypotetické mutační kroky, kterými se jednotlivé linie liší.

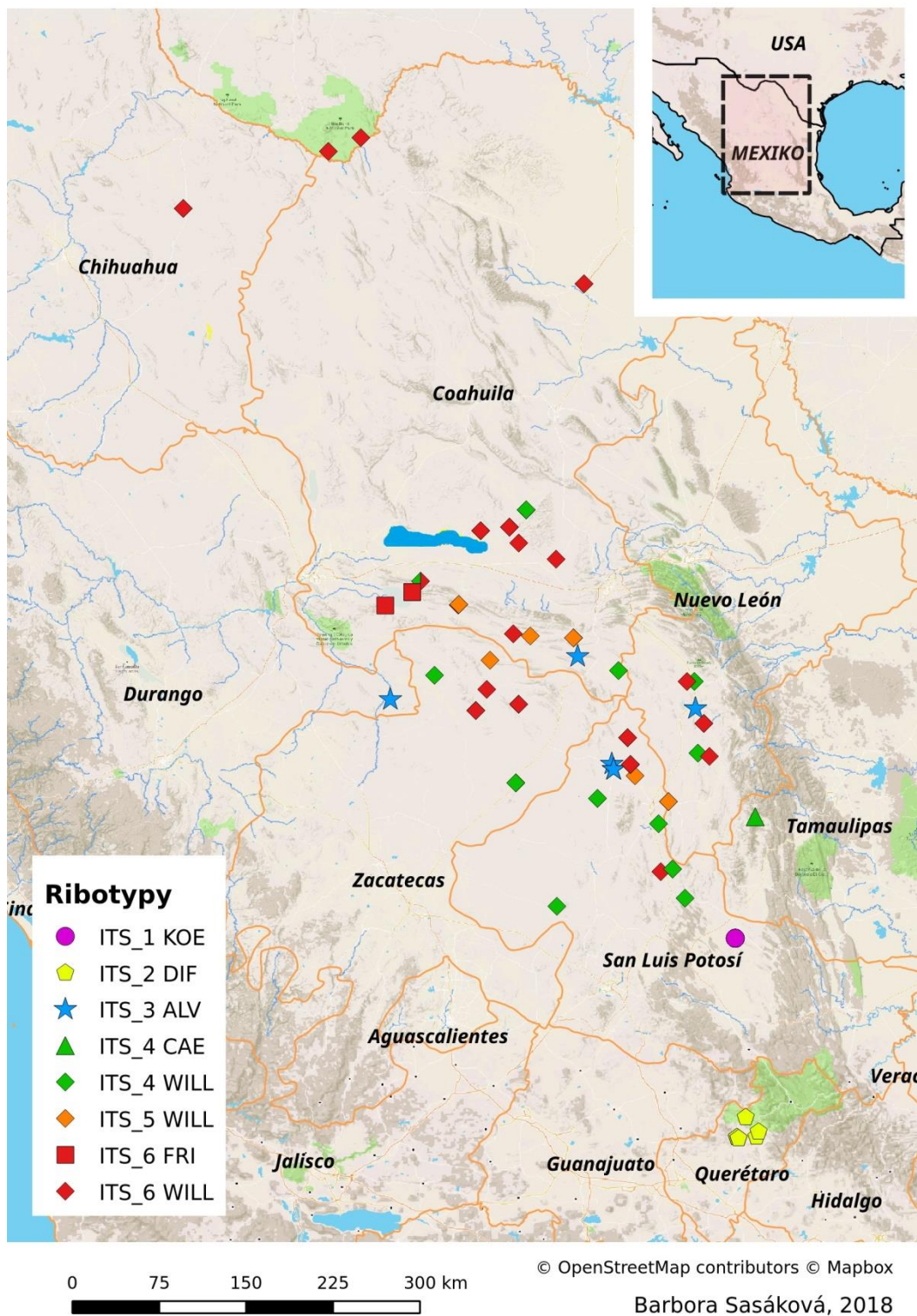


Obrázek 5: Parsimonická síť zobrazující nejpravděpodobnější vztahy mezi identifikovanými haplotypy (liniemi) Hap_1 až Hap_6. Červeným kruhem je označena pozice haplotypu s jeho označením a označením příslušného taxonu, pro který byla daná linie pozorována. Seznam vzorků patřících k jednotlivým liniím je v Tabulce 1. Menší modré kruhy označují hypotetické mutační kroky, kterými se jednotlivé linie liší.



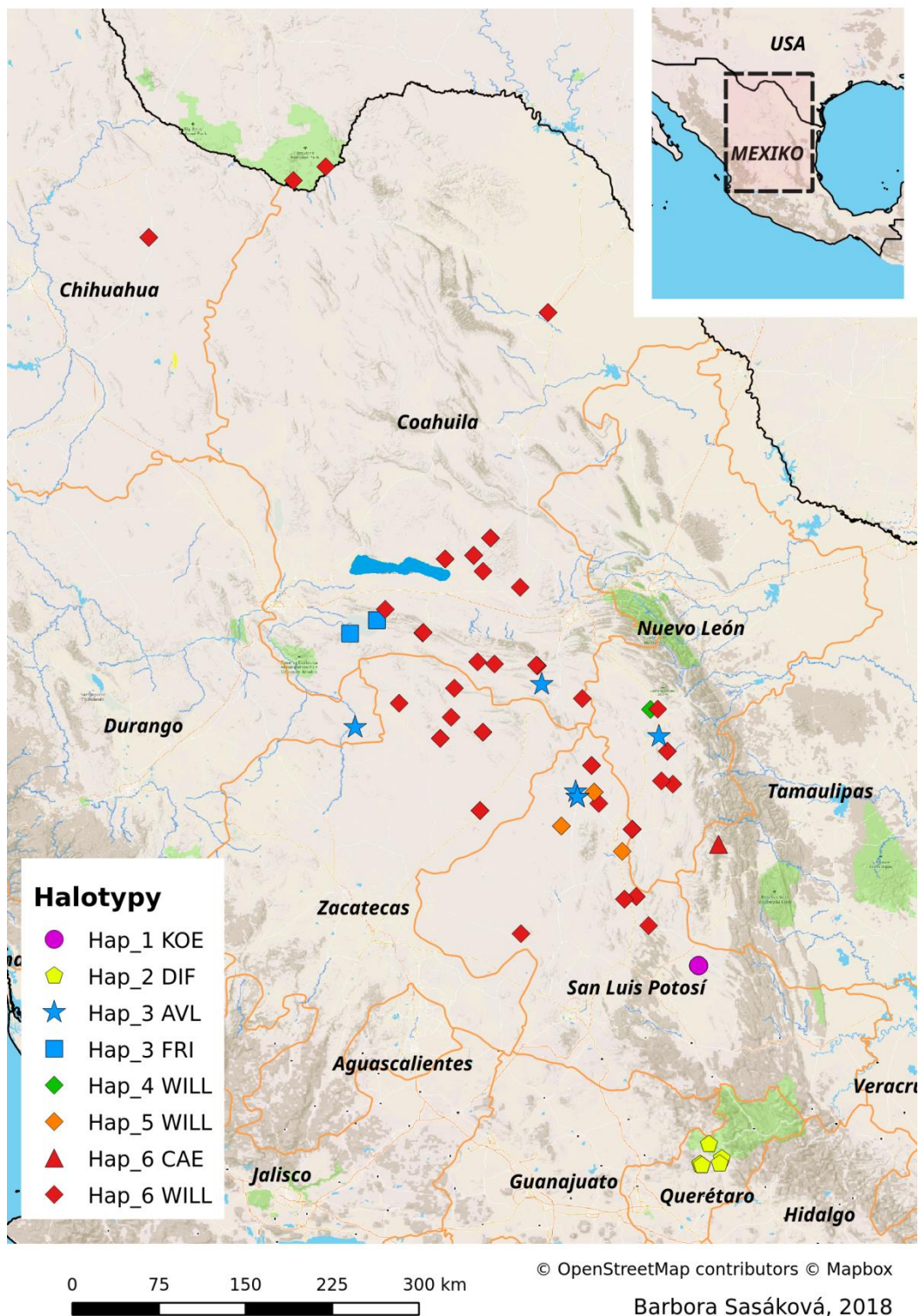
Obrázek 6: Parsimonická síť zobrazující nejpravděpodobnější vztahy mezi spojenými sekvencemi identifikovaných ribotypů a holotypů CON_1 až CON_10. Červeným kruhem je označena pozice genetických linií s jejím označením a označením příslušného taxonu, pro který byla daná linie pozorována. Seznam vzorků patřících k jednotlivým liniím je v Tabulce 1. Menší modré kruhy označují hypotetické mutační kroky, kterými se jednotlivé linie liší.

GEOGRAFICKÁ DISTRIBUCE RIBOTYPŮ v oblastech Mexiko a Texas (USA)



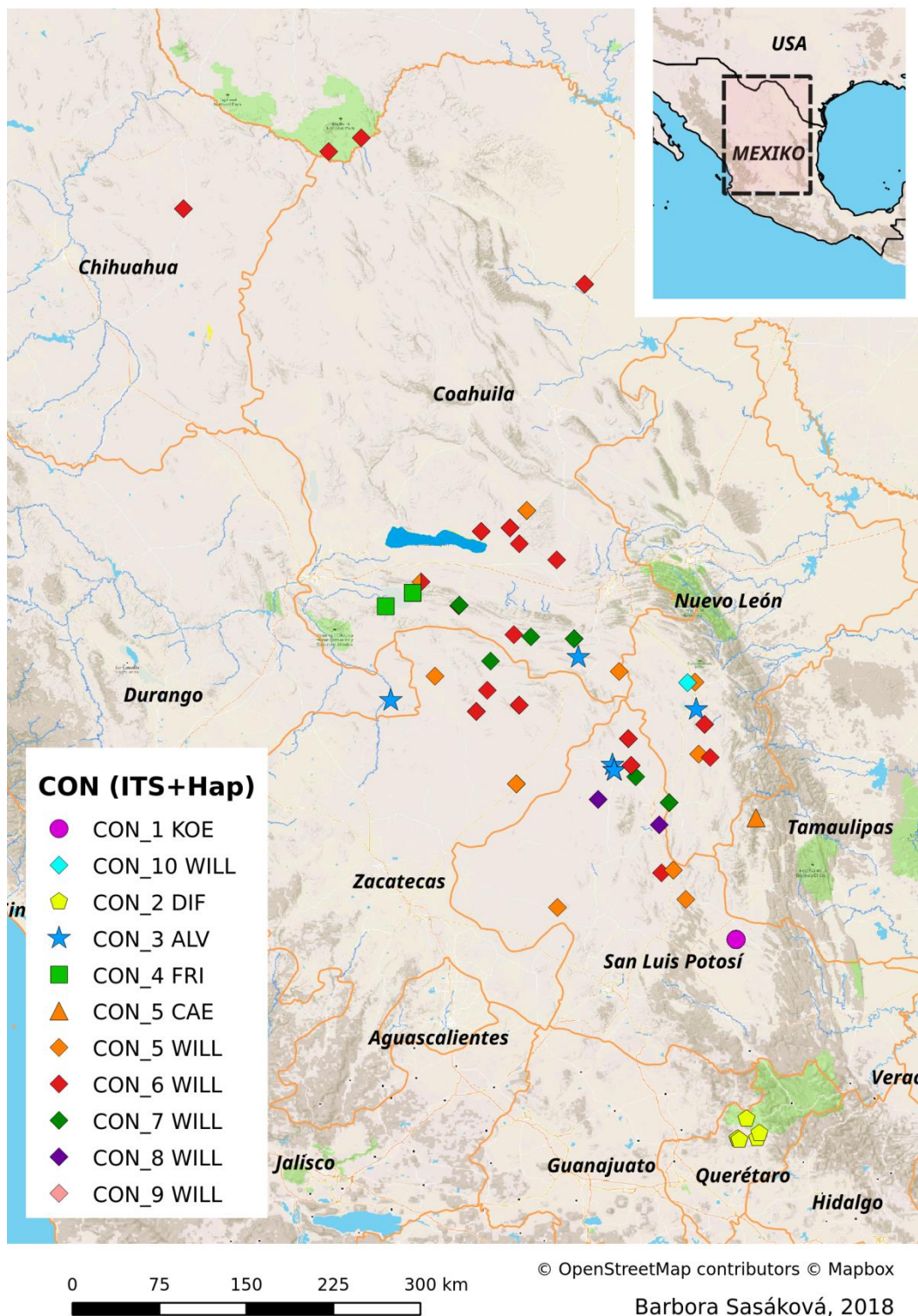
Obrázek 7: Mapa zobrazující geografickou distribuci identifikovaných ribotypů (linií) ITS_1 až ITS_6 v oblastech Texasu (USA) a Mexika. WILL – *Lophophora williamsii*; DIF – *L. diffusa*; FRI – *L. fricii*; KOE – *L. koehresii*; ALV – *L. alberto-vojtechii*; CAE – *L. williamsii* var. *caespitosa*; JOU – *L. jourdaniana*.

GEOGRAFICKÁ DISTRIBUCE HAPLOTYPŮ v oblastech Mexiko a Texas (USA)



Obrázek 8: Mapa zobrazující geografickou distribuci identifikovaných haplotypů (linií) Hap_1 až Hap_6 v oblastech Texasu (USA) a Mexika. WILL – *Lophophora williamsii*; DIF – *L. diffusa*; FRI – *L. fricii*; KOE – *L. koehresii*; ALV – *L. alberto-vojtechii*; CAE – *L. williamsii* var. *caespitosa*; JOU – *L. jourdaniana*.

GEOGRAFICKÁ DISTRIBUCE GENETICKÝCH LINIÍ v oblastech Mexiko a Texas (USA)



Obrázek 9: Mapa zobrazující geografickou distribuci spojených sekvencí identifikovaných ribotypů a haplotypů CON_1 až CON_10 v oblastech Texasu (USA) a Mexika. WILL – *Lophophora williamsii*; DIF – *L. diffusa*; FRI – *L. fricii*; KOE – *L. koehresii*; ALV – *L. alberto-vojtechii*; CAE – *L. williamsii* var. *caespitosa*; JOU – *L. jourdani*.

3. Diskuze

Cílem mé práce bylo pomocí vybraných polymorfních genetických markerů zhodnotit vymezení taxonů *Lophophora alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*, *L. jourdaniana*, *L. williamsii* a *L. williamsii* var. *caespitosa*, určit míru vnitrodruhové variability a zhodnotit mezidruhové vztahy mezi těmito taxony. Není mnoho vědeckých prací, které by se komplexně zaobíraly taxonomií nebo systematikou rodu *Lophophora*, pomineme-li množství článku popisující různé morfologické variety. Z hlediska obsahu mé práce jsou nejdůležitější následující práce: Anderson (1969), Boke a Anderson (1970), Bohata a kol. (2005) a Grym (2014), ve kterých je rod řešen komplexně. Anderson (1969) a Boke a Anderson (1970) jako první komplexně studovali ekologii, rozšíření, morfologii, karyologii rodu *Lophophora* se závěrem, že rod obsahuje pouze dva druhy, vysoce polymorfní *L. williamsii* s areálem sahajícím od Texasu (USA) až po střední Mexiko a *L. diffusa* s omezeným areálem ve státě Querétaro (Mexiko). Bohata a kolektiv (2005) jako první komplexně zpracovali monografii rodu *Lophophora*, ve které rozdělili rod do dvou sekcí, sekce *Lophophora* – obsahující jenom jeden polymorfní taxon *L. williamsii*, a sekce *Diffusae* – obsahující další tři taxony *L. diffusa*, *L. fricii* a *L. koehresii*. Čtvrtý taxon sekce *Diffusae* byl popsán stejným kolektivem autorů v roce 2008 (Bohata a kol. 2008). Práce Rudolfa Gryma (Grym 2014) představuje přehlednou a ucelenou studii rodu, zaměřenou spíše na popis jednotlivých taxonů, synonymních pojmenování a historii taxonomického členění rodu. Ucelená molekulární studie rodu však doteď chybí. Jedním z pokusů o molekulární studii taxonů rodu *Lophophora* představuje práce Araganeho (Aragane a kol. 2011), který použil chloroplastový lokus *trnL* intron–*trnL*–*trnF* pro odlišení taxonů *L. diffusa* od *L. williamsii*. Rostlinný materiál použitý v této studii pocházel však z internetového prodeje pěstovaných forem, tudíž taxonomické určení použitého materiálu je velice sporné a nemůže být použito ke genetické charakterizaci jednotlivých druhů.

Výsledek mé práce podporuje rozlišení pěti samostatných taxonů v rodě *Lophophora*, a to: *L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*, *L. williamsii* jako odlišných a samostatně stojících taxonomických jednotek – druhů. Tohle rozdělení koresponduje s aktuálním taxonomickým spravováním rodu (Bohata a kol. 2005; Grym 2014). Je však nutno podotknout, že tohle zdařilé zpracování rodu, je obecně téměř ignorováno širší botanickou veřejností a převládají názory, že v rodě by měl být

rozlišován jenom jeden polymorfní druh *L. williamsii*, nejvíce však dva druhy *L. williamsii* a *L. diffusa* (Anderson 1969; Boke a Anderson 1970).

Taxon *L. diffusa* je jedním z nejdéle rozlišovaných druhů rodu a tvoří bazální druh sekce *Diffusae*. Mezi hlavní rozlišovací znaky tohoto taxonu patří větší a plošší stonek šedavé až nažloutlé barvy s měkkou pokožkou dorůstající velkých rozměrů s difúzními žebry, které se rozpadají na jednotlivé hrboly. Květy jsou bílé a rostliny obsahují žádné nebo zanedbatelné množství meskalinu. *Lophophora diffusa* má velice omezený areál výskytu, údolí řeky Rio Extorax ve státě Querétaro, který je geograficky izolován od zbylých zástupců rodu. Zároveň *L. diffusa* představuje nejjížněji rostoucí druh celého rodu. V mé práci jsem použila devět jedinců z pěti lokalit. Všechny vzorky nesly shodný ribotyp (ITS_2) a také haplotyp (Hap_2), a tudíž tvořily jednu genetickou linii označenou jako CON_2 (Tab. 1), jasně odlišnou od všech ostatních linií (Obr. 1 až 6). Výraznou odlišnost tohoto druhu od zbylých lze zřejmě připsat zejména dlouhodobé geografické izolaci.

Taxon *L. koehresii* byl popsán jako varieta druhu *L. diffusa* (Říha 1996) a až recentně jako odlišný druh sekce *Diffusae*. K jeho vymezení jakožto samostatného druhu vedl zejména malý areál výskytu, pánev mezi Rio Verde (San Luis Potosí) a Tula (Tamaulipas), geografická izolace areálu od areálu *L. diffusa*, výrazný geofytický růst a další morfologické znaky (Bohata a kol. 2005). Pro taxon *L. koehresii* jsem měla k dispozici devět jedinců z jedné lokality, přičemž všichni jedinci nesli stejný ribotyp (ITS_1), haplotyp (Hap_1) a tudíž tvořili jednu genetickou linii (CON_1), která byla podobně jako v případě *L. diffusa* jasně odlišná od zbylých identifikovaných linií (Obr. 1 až 6). I když všech devět analyzovaných jedinců pocházelo ze stejné populace, nedomnívám se, že zařazení dalších jedinců z jiných populací by vedlo k odhalení vnitrodruhové variability u tohoto taxonu.

Taxon *L. alberto-vojtechii* je nejmladším z druhů, jenž byl popsán až v roce 2008 trojicí českých věhlasných odborníků na rod *Lophophora* a to kolektivem Bohata, Myšák, Šnicer (Bohata a kol. 2008). Tenhle druh je nejmenší ze všech popsáných druhů a jeho areál zaujímá poměrně velkou oblast vprostřed areálu druhu *L. williamsii*. Areál *L. alberto-vojtechii* není tedy geograficky izolován, prozatím ale nebyly nalezeny smíšené populace těchto dvou taxonů. To je nejspíš způsobeno odlišnou preferencí k stanovištním podmínkám, kdy *L. alberto-vojtechii* roste na plochých náplavových sedimentech měnících se v období dešťů v mazlavé bahno, zatímco *L. williamsii* roste od vápencových skal až po plochá údolí (Bohata a kol. 2005; 2009). Všech 25 mnou

analyzovaných jedinců pocházejících z pěti lokalit bylo homogenních, jak v ribotypu (ITS_3) tak v haplotypu (Hap_3) a tvořili jedinou genetickou linii označenou jako CON_3. Na rozdíl od předešlých dvou druhů, kterých sekvence byly jednoznačně odlišné od všech hodnocených taxonů, charakter identifikovaných linií u *L. alberto-vojtechii* byl více intermediární mezi *L. diffusa* – *L. koehresii* na straně jedné a *L. williamsii* na straně druhé (Obr. 1 až 6). *Lophophora alberto-vojtechii* je řazena do sekce *Diffusae*, což podporují i výsledky mé práce, kdy v parsimonické síti zkonstruované ze spojených alignmentů sekvenovaných lokusů, má tenhle taxon blíž k taxonům *L. diffusa* a *L. koehresii* než k *L. williamsii* (Obr. 6).

Zajímavým je případ taxonu *L. fricii*, jenž nese jméno po slavném českém cestovateli a nadšenému kaktusáři Albertu Vojtěchu Fričovi, a který byl popsán Habermannem v roce 1974 (Habermann 1974). Taxon je jednoznačně řazen do sekce *Diffusae* (Bohata a kol. 2005), no i přesto vykazuje určitou podobnost s taxonem *L. williamsii*. Já jsem měla k dispozici pět jedinců ze dvou lokalit a tři kulturně pěstované jedince. Všichni tito jedinci měli stejný haplotyp jako taxon *L. alberto-vojtechii* (Hap_3, Tab. 1) a ribotyp stejný jako část vzorků taxonu *L. williamsii* (ITS_6, Tab. 1). Po spojení sekvenovaných chloroplastových a jádrových lokusů je taxon *L. fricii* charakterizován jedinečnou genetickou linií označenou jako CON_4. Charakter této linie napovídá tomu, že v případě *L. fricii* by se mohlo jednat o mezidruhový hybrid vzniklý hybridizací mezi taxonem *L. alberto-vojtechii*^{♀Hap_3} a *L. williamsii*^{♂ITS_6}. Areál *L. fricii* je oblast označována jako Laguna de Viesca na jihozápadě státu Coahuila. Tato oblast představuje plochou pánev vyschlé laguny, která je ze všech stran kromě západní obklopena hradbami hor. V současné době nejsou známy smíšené populace, kde by se *L. fricii* vyskytovala spolu s jedním nebo oběma hypotetickými rodiči *L. williamsii* nebo s *L. alberto-vojtechii*. Nejbližší populace *L. williamsii* je vzdálená cca 10 km vzdušnou čarou (Grym 2014). Je však možné, že v minulosti mohly přijít taxony *L. alberto-vojtechii* a *L. williamsii* do styku, což mohlo vést k jejich hybridizaci výsledkem, který by mohl být právě taxon *L. fricii*. V oblasti vyschlé laguny se pak mohl tento hybridogenní taxon zachovat díky částečné izolovanosti, která znemožnila zpětné křížení s rodičovskými taxony. I když je tato teorie pravděpodobná, bylo by vhodné potvrdit hybridní charakter *L. fricii* sekvenováním vícero lokusů. V parsimonické síti (Obr. 6) se *L. fricii* nachází blízko *L. alberto-vojtechii*, co poukazuje také na značně intermediární charakter tohoto taxonu.

V případě taxonu *L. williamsii* jsem měla k dispozici 126 použitelných sekvencí jedinců ze 43 lokalit, víceméně rovnoměrně pokrývajících celkový areál rozšíření taxonu od Texasu (USA) na severu až po San Luis Potosí (Mexiko) na jihu. Celkově jsem pro taxon *L. williamsii* pozorovala tři ribotypy (ITS_4, ITS_5, ITS_6; Tab. 1) a tři haplotypy (Hap_4, Hap_5, Hap_6; Tab. 1). Po spojení jádrových a chloroplastových linií jsem rozlišila šest genetických linií (CON_5 až CON_10; Tab. 1). Všechny tyto linie byly charakteristické jenom pro tenhle taxon. Genetická variabilita mezi jednotlivými liniemi byla nízká (Obr. 1 až 3). Analýza pomocí statistické parsimonie ukázala, že všech šest rozlišených genetických linií je si navzájem více podobných, a tedy i příbuzných, než jsou tyto linie podobné s některým z ostatních zkoumaných taxonů (Obr. 5 až 6). Jedinou výjimkou je výše popsáný případ taxonu *L. fricii*. Co se týče geografického paternu v distribuci pozorovaných linií (CON_5 až CON_10), tak ten má severo-j jižní tendenci. Genetická linie CON_5 je častější v jižní části a na periferii areálu *L. williamsii* odkud přesahuje až do severní části areálu, kde končí v státě Coahuila. Nejpočetnější linie CON_6 je naopak četnější v severní a centrální části areálu, přesahuje i do jižní části, kde vyznívá ve státě San Luis Potosí (Obr. 9). Linie CON_7 se nachází v centrální části v státech Coahuila, Zacatecas a San Luis Potosí. Linie CON_8 a CON_9 jsou lokalizovány v jižní části areálu ve státě San Luis Potosí. Linie CON_10 je tvořena jenom jedním jedincem a nachází se na východní periferii areálu ve státě Nuevo León (Obr. 9).

Lophophora jourdaniana byla popsána jako samostatný druh Habermannem v roce 1975 hlavně díky výrazně tmavorůžovému květu (Habermann 1975). Já jsem měla k dispozici tři kulturně pěstované jedince a všichni nesli stejný ribotyp (ITS_4, Tab. 1) i haplotyp (Hap_6, Tab. 1) a po spojení tvořili genetickou linii označenou jako CON_5. Tahle linie nebyla charakteristická pro taxon *L. jourdaniana*, nýbrž představovala druhou nejčetnější linii taxonu *L. williamsii* (Tab. 1). Grym (2014) uvádí v diskuzi pro tenhle taxon zmínku o tom, že by *L. jourdaniana* mohla představovat hybridní taxon mezi *L. williamsii* a *L. diffusa* vzniklý v kultuře. Na základě získaných výsledků je zřejmé, že tahle teorie je nepravděpodobná, jelikož hybridní původ by se nutně projevil alespoň v jednom sekvenovaném lokusu. Jednoznačný závěr z toho tedy je, že tenhle taxon je konspecifický s taxonem *L. williamsii* a nemá proto význam jeho rozlišování jako samostatného druhu. Jméno *Lophophora jourdaniana* proto představuje synonymum k jménu *L. williamsii* a mělo by být také náležitě používáno.

Lophophora williamsii var. *caespitosa* je jméno nakombinované Ito (1952) pro formu *L. williamsii* která je charakteristická nápadným vegetativním odnožováním, přičemž tato vlastnost zůstává zachována v potomstvu (Grym 2014). Tato růstová forma je charakteristická zejména pro rostliny z okolí lokality La Perdida (stát Tamaulipas, Mexiko) (Bohata a kol. 2005; Grym 2014). V mé práci jsem měla k dispozici tři jedince z lokality „La Perdida“, kteří měli stejný ribotyp a haplotyp jako výše popsaná *L. jourdaniana* (Tab. 1), a tedy tenhle taxon představuje druhou nejpočetnější linii taxonu *L. williamsii* (Tab. 1). Je tedy zřejmé, že se v tomto případě nejedná o odlišný druh nebo poddruh, nýbrž o růstovou formu, která může i nemusí být geneticky podmíněna. Zde by bylo ještě zajímavé porovnat tyto vzorky s kulturně pěstovanými vzorky tzv. „caespitosy“, zda by se potvrdila domněnka, že pěstovaná „caespitosa“ je shodná s „caespitosou“ od La Perdidy.

Co lze tedy říct o biosystematice rodu *Lophophora*? Ze získaných výsledků je patrných několik faktů. Za prvé je patrné, že zkoumané taxony jsou si po genetické stránce velice podobné. Lze se tedy domnívat, že speciace v rodě proběhla v relativně nedávné době, která nebyla dostatečná pro nahromadění většího množství rozdílů v DNA. Za druhé, jako hlavní speciální mechanismus v rodě se zdá být geografická izolace (peripatrická speciace; taxony *L. diffusa*, *L. koehresii*), ekologická speciace (parapatrická speciace; taxon *L. alberto-vojtechii* se v rámci areálu *L. williamsii* specializoval na odlišnou ekologickou niku) a jako třetí hybridizace (taxon *L. fricii*). Třeba však říct, že poslední dva typy jsou prozatím jenom hypotetické a je nutno získat více důkazů pro jejich přijetí. Za třetí, centrum genetické diverzity rodu se nachází v centrální a jižní části celkového areálu (stát San Luis Potosí), z čeho lze usuzovat, že k formování rodu došlo právě někde v těchto oblastech někdy na průlomu třetihor a čtvrtohor. Za čtvrté, v rodě *Lophophora* je možné jak po morfologické (Bohata a kol. 2005; Grym 2014), tak po genetické stránce (tahle práce) rozlišit pět samostatných taxonomických jednotek (*L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*, *L. williamsii*), kterým lze přisoudit status odlišných druhů. Subgenerické rozdělení rodu na dvě sekce (sekce *Lophophora* a sekce *Diffusae* – Bohata a kol. 2005) zdá se být opodstatněné, přičemž taxony *L. alberto-vojtechii* a *L. fricii* tvoří přechodovou formu mezi těmito dvěma skupinami. Taxon *L. williamsii*, u kterého je známo a bylo popsáno množství forem (např. Bohata a kol., 2005; Grym 2014), by se měl hodnotit jako jeden polymorfní druh s množstvím forem, které vytváří ve svém rozsáhlém areálu. Prozatím však není opodstatněné k vyčleňování jednotlivých forem a jejich popisování jakožto

samostatných druhů nebo poddruhů, protože tyto morfologické/růstové odchylky nemusí být nutně geneticky podmíněny (viz výše popsané případy dvou taxonů *L. jourdaniana* a *L. williamsii* var. *caespitosa*).

4. Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo vybrat vhodné polymorfní genetické markery pro molekulární charakterizaci druhů a studium fylogeneze rodu *Lophophora*. K testování bylo použito devět úseků chloroplastové a pět úseků jaderné DNA. Pro další analýzy byly nakonec vybrány tři lokusy; jeden jaderný (ITS) a dva chloroplastové (trnT-trnL a trnL-trnF). Sekvenováním těchto lokusů bylo rozlišeno šest ribotypových a šest haplotypových linií. Po spojení ITS a chloroplastových lokusů bylo rozlišeno 10 genetických linií. Čtyři z těchto linií byly charakteristické pro čtyři zkoumané taxony: CON_1 pro *L. koehresii*, CON_2 pro *L. diffusa*, CON_3 pro *L. alberto-vojtechii* a CON_4 pro *L. fricii*. Zbylých šest linií (CON_5 až CON_10) bylo vlastních taxonu *L. williamsii*. Vztahy mezi odlišnými liniemi byly pro nízkou variabilitu zkoumány jenom prostřednictvím parsimonických sítí. Taxon *L. diffusa* je dobrý taxon a jeho rozlišení jako samostatného druhu má své opodstatnění. Taxon *L. koehresii* je také geneticky jednoznačně odlišitelný a označit ho za samostatný druh má také své opodstatnění. I taxon *L. alberto-vojtechii* se dá považovat za samostatný druh. Podle sekvenovaných lokusů se zdá, že taxon *L. fricii* je hybridogenním taxonem, přičemž rodičovské druhy jsou *L. alberto-vojtechii*[♀] a *L. williamsii*[♂]. Taxon *L. williamsii* je druh vysoce polymorfní a zatím není důvod ho dělit na více taxonů. Taxon *L. jourdaniana* je geneticky shodný s taxonem *L. williamsii* ve všech zkoumaných úsecích DNA, měl by proto být označován jako *L. williamsii*. Taxon *L. williamsii* var. *caespitosa* představuje stejnou genetickou linii jako *L. jourdaniana*, která je druhou nejčtenější linií pozorovanou pro taxon *L. williamsii*, a nelze tedy tuto růstovou formu vyčlenit jako samostatný druh. Hodnocení na úrovni variety je však akceptovatelné.

Ze získaných výsledků zejména z malého počtu variabilních pozic u jinak hypervariabilních lokusů (ITS, trnL-trnF) je zřejmé, že zkoumané taxony jsou si po genetické stránce velice podobné. Lze se tedy domnívat, že speciace v rodě proběhla v relativně nedávné době, která nebyla dostatečná pro nahromadění většího množství rozdílů v DNA. Při hodnocení míry variability mezi zkoumanými taxony je však třeba vzít v potaz možnost, že sekvenování dalších lokusů by přineslo větší množství variabilních pozic, které by mohly odhalit vnitrodruhovou variabilitu taxonů, pro které byla pozorována jenom jedna linie (*L. alberto-vojtechii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*).

Pokládám za významné se rodem dále zabývat z hlediska molekulární biosystematiky a nalézt další a dostatečně polymorfni genetické markery, které by přinesly ještě více světla do studované problematiky.

Seznam použité literatury

- Aktas C. (2015): Haplotypes: Haplotype inference and statistical analysis of genetic variation. R package version 1.0. <https://CRAN.R-project.org/package=haplotypes>.
- Anderson E.F. (1969): The biogeography, ecology and taxonomy of *Lophophora* (Cactaceae). *Brittonia* 21:299–310.
- Aragane M., Sasaki Y., Nakajima J., Fukumori N., Yoshizawa M., Suzuki Y. et al. (2011): Peyote identification on the basis of differences in morphology, mescaline content, and trnL/trnF sequence between *Lophophora williamsii* and *L. diffusa*. *Journal of Natural Medicine* 65:103–10.
- Blattner F.R. (2016): *TOPO6*: a nuclear single-copy gene for plant phylogenetic inference. *Plant Systematics and Evolution* 302:239–244.
- Bohata J., Myšák V., Šnicer J. (2005): Genus *Lophophora* Coulter. *Kaktusy* (Speciál 2):1–45.
- Bohata J., Myšák V., Šnicer J. (2008): *Lophophora alberto-vojtechii*. *Cactus & Co.* 2:105–117.
- Bohata J., Myšák V., Šnicer J. (2009): Nejmenší z lofofor – *Lophophora alberto-vojtechii* J. Bohata, V. Myšák & J. Šnicer. *Kaktusy* 45:60–65.
- Boke N.H., Anderson E.F. (1970): Structure, development, and taxonomy in the genus *Lophophora*. *American Journal of Botany* 57:569–578.
- Coulter J.M. (1891): *Contributions from the U. S. National Herbarium* Vol. 2.:129.

- Coulter J.M. (1894): *Contributions from the U. S. National Herbarium* Vol. 3.:91-132.
- Dunning L.T., Savolainen V. (2010): Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164:1–9.
- Engelmann G. (1859): Cactaceae of the boundary. *United States and Mexican Boundary Survey* Vol. 2.:74.
- Franck A.R., Cochrane B.J., Garey J.R. (2012): Low-copy nuclear primers and *ycf1* primers in Cactaceae. *American Journal of Botany*, e405–407.
- Grym R. (2014): Rod *Lophophora*. *Spoločnosť Cactaceae etc.*, Bratislava, Slovensko.
- Habermann V. (1974): *Lophophora fricii* Habermann species nova. *Kaktusy* 74:123–127.
- Habermann V. (1975): *Lophophora jourdaniana* Habermann species nova. *Kaktusy* 75:3–6.
- Heffter A. (1898): Ueber Pellote. Beiträge zur chemischen und pharmakologischen Kenntniss der Cacteen Zweite Mittheilung. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 40:385–429.
- Ito Y. (1952): *Lophophora williamsii* var. *caespitosa* I.Yto. *Cacti* 96.
- Jobes V.D., Hurley D.L., Thien L.B. (1995): Plant DNA Isolation: A method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. *Taxon* 44:379–386.

- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647-1649.
- Olson M.E. (2002): Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (*Brassicales*). *Systematic Botany* 27:55–73.
- Perrine D. (2001): Visions of the Night: Western medicine meets peyote 1887-1899. *The Heffter Review of Psychedelic Research* 2:6–52.
- QGIS Team (2013): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <https://qgis.org>
- R Core Team (2017): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rowley G.D. (2006): Lophophora - species and cultivars. *British Cactus and Succulent Society* 24:201–209.
- Říha J. (1996): *Lophophora diffusa* var. *koehresii* Říha. *Kaktusy* 96:70–73.
- Salm-Dyck J. (1844): *Cactus Hortus Dyckensis* 17:169.
- Sánchez-Hernández C., Gaytán-Oyarzún J.C. (2006): Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharides and secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology* 20:1864–1867.

- Sasáková B. (2015): Rod *Lophophora* J. M. Coult. I. Taxonomie rodu, izolace DNA a výběr molekulárních markerů pro biosystematickou studii. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Sirpin K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. (2005): The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92:142–166.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105–1109.
- Tate J.A., Simpson B.B., (2003): Paraphyly of *Tarasa* (*Malvaceae*) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28:723–737.
- Terry M., Steelman K.L., Guilderson T., Dering P., Rowe M.W. (2006): Lower Pecos and Coahuila peyote: New radiocarbon dates. *Journal of Archaeological Science* 33:1017–1021.
- Villesen P. (2007): FaBox: an online fasta sequence toolbox, <http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>
- Voss A. (1896): Beschreibung, Kultur und Verwendung des gesamten Pflanzenmaterials für deutsche Gärten. *Vilmorin's Blumengärtnerei* Vol. 1.:368.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H.,

Sninsky J.J., White T.J. eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*: 315–322.

Seznam použitých zkratek

A	Adenin
ALV	<i>Lophophora alberto-vojtechii</i>
C	Cytosin
CAE	<i>Lophophora williamsii</i> var. <i>ceaspitosa</i>
cpDNA	Chloroplastová DNA
DIF	<i>Lophophora diffusa</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FRI	<i>Lophophora fricii</i>
G	Guanin
Hap	Haplotyp
ID	Identifikační číslo
ITS	Internal transcribed spacer
JOU	<i>Lophophora jourdaniana</i>
KOE	<i>Lophophora koehresii</i>
min.	Minuty
mtDNA	Mitochondriální DNA
ncDNA	Jaderná DNA
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PEG	Polyethylglykol
s	Sekundy
T	Thymin
Ta	Annealingová teplota
WILL	<i>Lophophora williamsii</i>

5. Přílohy

Tabulka 1: Použitý rostlinný materiál

ID	Taxon	Původ	Počet analyzovaných jedinců	trnT-trnL+trnL-trnF haplotyp	ITS ribotyp	cpDNA + ITS genetická linie
1	WILL	Zac. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
2	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
3	FRI	KR	1	HAP_3	ITS_6	CON_4
4	ALV	S.L.P. (MEX)	3	HAP_3	ITS_3	CON_3
5	WILL	S.L.P. (MEX)	4	HAP_6	ITS_4/ITS_6	CON_5/CON_6
6	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
7	ALV	S.L.P. (MEX)	1	HAP_3	ITS_3	CON_3
8	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_5	CON_7
9	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_5	CON_7
10	WILL	N.L. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
11	WILL	Coah. (MEX)	4	HAP_6	ITS_6	CON_6
12	WILL	Coah. (MEX)	4	HAP_6	ITS_6	CON_6
13	WILL	N.L. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
14	WILL	Coah. (MEX)	1	X	X	X
15	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_5	CON_7
16	ALV	Dur. (MEX)	6	HAP_3	ITS_3	CON_3
17	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_5	CON_7
18	WILL	N.L. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
19	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
20	WILL	Zac. (MEX)	4	HAP_6	ITS_4	CON_5
21	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
22	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
23	WILL	Coah. (MEX)	4	HAP_6	ITS_6	CON_6
24	ALV	S.L.P. (MEX)	3	HAP_3	ITS_3	CON_3
25	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
26	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_5	ITS_4	CON_8
27	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
28	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_5	ITS_6	CON_9
29	ALV	S.L.P. (MEX)	1	HAP_3	ITS_3	CON_3
30	ALV	N.L. (MEX)	2	HAP_3	ITS_3	CON_3
31	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4/ITS_6	CON_5/CON_6
32	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
33	WILL	Zac. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
34	WILL	N.L. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
35	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
36	WILL	Coah. (MEX)	4	HAP_6	ITS_4	CON_5
37	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_6	ITS_5	CON_7
38	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6

ID	Taxon	Původ	Počet analyzovaných jedinců	trnT-trnL+trnL-trnF haplotyp	ITS ribotyp	cpDNA + ITS genetická linie
39	WILL	N.L. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
40	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_5	ITS_4	CON_8
41	WILL	Zac. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
42	WILL	Coah. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
43	WILL	Coah. (MEX)	3	HAP_6	ITS_5	CON_7
44	WILL	N.L. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
45	ALV	S.L.P. (MEX)	2	HAP_3	ITS_3	CON_3
46	ALV	S.L.P. (MEX)	3	HAP_3	ITS_3	CON_3
47	WILL	S.L.P. (MEX)	7	HAP_5	ITS_6	CON_9
48	WILL	Zac. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
49	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_4	CON_5
50	WILL	S.L.P. (MEX)	2	HAP_6	X	X
51	WILL	S.L.P. (MEX)	3	HAP_6	ITS_4	CON_5
52	WILL	Coah. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
53	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_5	CON_7
54	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
55	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_5	ITS_4	CON_8
56	WILL	Dur. (MEX)	2	X	X	X
57	WILL	Zac. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
58	WILL	Zac. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
59	ALV	S.L.P. (MEX)	1	HAP_3	ITS_3	CON_3
60	WILL	Coah. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
61	WILL	Coah. (MEX)	1	HAP_6	ITS_5	CON_7
62	WILL	Coah. (MEX)	1	HAP_6	ITS_5	CON_7
63	WILL	Chih. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
64	WILL	KR	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
65	WILL	Texas (USA)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
66	WILL	KR	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
67	WILL	Zac. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
68	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
69	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
70	WILL	Coah. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
71	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_5	ITS_6	CON_9
72	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	X	X
73	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
74	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
75	WILL	Chih. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
76	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
77	KOE	S.L.P. (MEX)	1	HAP_1	ITS_1	CON_1
78	WILL	S.L.P. (MEX)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
79	FRI	KR	1	HAP_3	ITS_6	CON_4
80	WILL	Zac. (MEX)	4	HAP_6	ITS_4	CON_5

ID	Taxon	Původ	Počet analyzovaných jedinců	trnT-trnL+trnL-trnF haplotyp	ITS ribotyp	cpDNA + ITS genetická linie
84	KOE	S.L.P. (MEX)	3	HAP_1	ITS_1	CON_1
86	KOE	S.L.P. (MEX)	4	HAP_1	ITS_1	CON_1
87	WILL	Coah. (MEX)	4	X	X	X
90	WILL	Zac. (MEX)	4	HAP_6	ITS_5	CON_7
93	ALV	Coah. (MEX)	4	HAP_3	ITS_3	CON_3
94	FRI	Coah. (MEX)	2	HAP_3	ITS_6	CON_4
95	CAE	Tam. (MEX)	3	HAP_6	ITS_4	CON_5
97	WILL	Zac. (MEX)	2	HAP_6	ITS_6	CON_6
98	FRI	Coah. (MEX)	2	HAP_3	ITS_6	CON_4
99	DIF	Que. (MEX)	4	HAP_2	ITS_2	CON_2
100	WILL	Zac. (MEX)	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
101	JOU	KR	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
102	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
103	WILL	KR	1	HAP_6	ITS_6	CON_6
104	FRI	KR	1	HAP_3	ITS_6	CON_4
105	JOU	KR	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
106	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
107	WILL	N.L. (MEX)	1	HAP_4	ITS_6	CON_10
108	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
110	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
111	FRI	Coah. (MEX)	1	HAP_3	ITS_6	CON_4
112	KOE	S.L.P. (MEX)	1	HAP_1	ITS_1	CON_1
114	KOE	S.L.P. (MEX)	1	HAP_1	ITS_1	CON_1
116	JOU	KR	1	HAP_6	ITS_4	CON_5
119	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
120	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
122	DIF	Que. (MEX)	1	HAP_2	ITS_2	CON_2
123	KOE	S.L.P. (MEX)	1	HAP_1	ITS_1	CON_1
124	WILL	Texas (USA)	1	HAP_6	ITS_6	CON_6

WILL – *L. williamsii*; DIF – *L. diffusa*; FRI – *L. fricii*; KOE – *L. koehresii*; ALV – *L. alberto-vojtechii*; CAE – *L. williamsii* var. *caespitosa*; JOU – *L. jourdaniana*. Federální státy Mexika: Zac. – Zacatecas, S.L.P. – San Luis Potosí, Coah. – Coahuila, N.L. – Nuevo León, Dur. – Durango, Chih. – Chihuahua, Tam. – Tamaulipas, Que. – Querétaro, KR – kulturní rostlina. MEX – Mexiko; USA – Spojené státy americké, * – sušené vzorky, X – chybějící data.

Tabulka 2: Teploty nasedání primerů (annealing temperature Ta)

primer	Ta	Zdroj
Chloroplastové úseky		
trnT-trnL	52°C	primer <i>a</i> a <i>b</i> : Taberlet a kol. 1991
trnL-trnF	52°C	primer <i>e</i> a <i>f</i> : Taberlet a kol. 1991
matK	48°C	primer <i>AST_F</i> a <i>AST_R</i> : Dunning a Savolainen 2010
rpS16	54°C	primer <i>rpS16F</i> a <i>rpS16R</i> : Shaw a kol. 2005
rpL16	50,5°C	primer <i>rpl16-int621F</i> a <i>rpl16-int446R</i> : Franck a kol. 2012
trnC-trnD	54°C	primer <i>trnC^{GCA}</i> a <i>trnD^{GUC}</i> : Shaw et al. 2005
trnS-trnG	66°C	primer <i>trnS^{GCU}</i> a <i>trnG^{UUC}</i> : Shaw et al. 2005
psbA-trnH	54°C	primer <i>psbA</i> a <i>trnH</i> : Tate a Simpson 2003
ycf1	45°C	primer <i>ycf1-4182F</i> a <i>ycf1-5248R</i> : Franck a kol. 2012
Jádrové úseky		
ITS	56°C	primer <i>ITS1</i> a <i>ITS4</i> : White a kol. 1990
topo6	55°C	primer <i>top6_2F_305</i> , <i>Top6_3F_464</i> a <i>Top6_8R_1680</i> : Blattner 2016
isi	45°C	primer <i>isi-ex3F</i> a <i>isi-ex5R</i> : Franck a kol. 2012
nhx1	51°C	primer <i>nhx-ex2F</i> a <i>nhx3R</i> : Franck a kol. 2012
ppc	55°C	primer <i>PPCX4F</i> a <i>PPCX5R</i> : Olson 2002

Seznam 1 Použité přístroje a laboratorní vybavení

- Centrifuga Eppendorf® 5804 R (Eppendorf, Německo)
- Digestor (Merci, Česká republika)
- Dokumentační systém Fire-Reader V4 (UVITEC, Velká Británie)
- Elektroforéza OWL A6; Easy Cast OWL B1 (Fisher Thermo Scientific, USA)
- Flowbox PV-100 (Telstar, Španělsko)
- Homogenizátor Fastprep® 24 (MP Biomedical, Francie)
- Laboratorní váha PM 2000 (Mettler-Toledo, USA)
- Míchačka s magnetickým ohřevem VMS-C7 (VWR, USA)
- Mikropipety Eppendorf, 0.1 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)
- Spektrometr NanoDrop 2000 (Fisher Thermo Scientific, USA)
- Sušárna (Chirana, Slovensko)
- Termomixér Mixing Block MB-102 (Bioer, Čína)
- Vortex MS2 mini; MS3 basic (IKA, Německo)
- Výrobník ledu (Bar Line, Itálie)

Seznam 2 Použité chemikálie a roztoky

- Agaróza (SERVA, Německo)
- Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs), (Promega, USA)
- Destilovaná voda
- Ethanol 96% (Lach-Ner, Česká republika)
- Ethylendiaminotetraacetát disodný (Na_2EDTA), (VWR, USA)
- GelRed (Biotum, USA)
- Chlorid sodný (NaCl), (Lach-Ner, Česká republika)
- Chloroform (Lach-Ner, Česká republika)
- Isoamylalkohol (Lach-Ner, Česká republika)
- Isopropanol (Lach-Ner, Česká republika)
- KapaTaq polymeráza (Kapabiosystems, Boston, USA)
- Kyselina boritá (H_3BO_3), (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA), (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
- Octan sodný (NaOAc), (TAMDA, Česká republika)
- Polyethylenglykol (PEG), (Sigma-Aldrich, USA)
- Polyvinylpyrolidin (PVP), (Sigma-Aldrich, USA)
- Rnáza (Biobasic, Kanada)
- Sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Trishydroxymethylaminomethan (TRIS), (Sigma-Aldrich, USA)
- β -merkптоethanol (β -ME), (Sigma-Aldrich, USA)

3 % CTAB, 200 ml

- 20 ml 1M Tris, pH=8
- 8 ml 0,5M EDTA, pH=8
- 6 g CTAB
- 35,06 g NaCl
- Doplňit destilovanou vodou do 200 ml

70% Etanol (EtOH), 50 ml

- 37 ml 96% EtOH
- Doplňit destilovanou vodou do 50 ml

80% Etanol (EtOH), 50 ml

- 42 ml 96% EtOH
- Doplňit destilovanou vodou do 50 ml

Směs chloroform:isoamylalkohol 24:1 (Chl:IAA), 100 ml

- 4 ml isoamylalkoholu
- 96 ml chloroformu

Roztok octanu sodného (NaOAc), pH=5,2 100 ml

- 24,6 g NaOAc
- 50 ml destilované H₂O
- Kyselina octová pro upravení pH na 5,2
- Doplňit destilovanou vodou do 100 ml

Sorbitolový pufr, 200 ml

- 100 ml destilované vody
- 20 ml 1M Tris, pH=8
- 2 ml 0,5M EDTA, pH=8
- 12,76 g sorbitolu
- Doplnit destilovanou vodou do 200 ml

10X TBE pufr, 1000 ml

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 55 g H_3BO_3
- 40 ml 0,5M Na_2EDTA , pH=8
- Rozpustit v 900 ml destilované vody
- Doplnit do 1 l destilovanou vodou