

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra genetiky a šlechtění

Extrakce DNA pro účely genetické analýzy borovice černé (*Pinus nigra*)

Bakalářská práce

Autor práce: Eva Zusková

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Extrakce DNA pro určení genetické analýzy borovice černé (*Pinus nigra*), jsem vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 13.4.12 Eva Zusková

Souhrn

Tato práce je zaměřená na problematiku analýzy DNA a to především z nahosemenných, zvláště z čeledi *Pinaceae*. V první kapitole je popsána historie a postupné rozšíření čeledě. Dále její členění a hlavní znaky, kterými se vyznačuje. Druhá kapitola mapuje borovici černou, jejíž genetická analýza je předmětem vlastního výzkumu. Je zde opět rozebrána její historie, ale také využití ve výsadbách a jsou uvedeny některé již stávající výsadby. Dále je zde popsán její vzhled a vybrané kultivary, stejně tak jako jednotlivé subspecie spadající pod tento druh. Třetí kapitola popisuje analýzu DNA, DNA jako takové a následně vybrané metody jak extrakční, tak PCR. Kapitola také obsahuje popisy zařízení, na nichž jsou pokusy realizovány.

Vlastní práce byla zaměřena hlavně na extrakci DNA z 32 exemplářů borovice černé odebraných ve dvou oblastech Prahy, konkrétně na Barrandovské skále a v areálu ČZU. Extrakce DNA ze vzorků proběhla za pomoci kitu DNeasy Plant Mini Kit. Výsledky extrakce byly vyhodnoceny elektroforeticky a porovnány se spektrofotometrickým měřením. Získané vzorky DNA byly dle výsledků spektrofotometrického měření naředěny na koncentraci 20 ng/μl s cílem vyšší vyrovnanosti koncentrace DNA. Průměrná hodnota koncentrace DNA byla 54,65 ng/μl při směrodatné odchylce 25,83 ng/μl. Hodnota variačního koeficientu byla 0,47. Získaná variabilita je vysoká a to bych přisuzovala jak různosti jednotlivých výsadeb, tak časovým odstupům mezi sběry. Průměr absorbance 260/280 byl 1,752 a hodnota při 260/230 činila 2,512. Pro zvýšení homogenity vzorků DNA by bylo vhodné zařadit automatizovanou homogenizaci materiálu.

Výsledky získané v rámci této práce budou následně využity pro hodnocení genetické variability výsadeb borovice černé ve vybraných lokalitách Prahy.

Klíčová slova: *Pinaceae*, *Pinus nigra*, analýza DNA, metody extrakce DNA, výtěžnost DNA

Summary

The bachelor thesis deals with analysis of DNA mainly from gymnosperms, especially from the family *Pinaceae*. The first chapter describes the history and progressive extension of the family. In addition, it describes structure and main features which characterizing the species. The second chapter maps the pine nigra, its genetic characteristic is subject of research. There is also analyzed its history, but also use in planting, or are some already

existing plantings. At this thesis is described her appearance and selected cultivars and individual subspecies which are under the species. The third chapter describes analysis of DNA, DNA structure and then selected methods of PCR. Chapter includes descriptions of equipment on which experiments are carried out.

The thesis was mainly focused on the extraction of DNA from 32 samples of pine nigra pick up from two areas in Prague, specifically from Barrandov rock and ČZU area. DNA extraction from samples was held by DNeasy Plant Mini Kit. The results of extraction were evaluated electrophoretic and compared with spectrophotometer measurement. Obtained DNA samples on the bases from spectrofotometr measurements were diluted to a concentration 20 ng/μl for high equilibrium of DNA concentration. The average value of DNA concentration was 54.65 ng/μl , with standard deviation 25.83 ng/μl and value of the variation coefficient was 0.47. Obtained variability was high, the mason can bet he diversity of individual growth same as time between collections. Average absorbance 260/280 was 1.752 and the value at 260/230 was 2.512. For increase the homogeneity of the DNA samples can be use automated homogenization.

The results obtained in this work will be used to evaluate the genetic variability of pine nigra in selected localities of Prague.

Key words: *Pinaceae*, *Pinus nigra*, DNA analysis, DNA extraction methods, DNA yield

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. <i>Pinus</i>	3
3.2. <i>Pinus nigra</i>	4
3.2.1. Historie, introdukce	4
3.2.2. Vlastnosti	4
3.2.2.1. Vybrané kultivary	5
3.2.3. Použití	5
3.2.4. Subspecie	6
3.3. Studium variability <i>Pinus nigra</i>	6
3.3.1. DNA	6
3.3.2. Analýza DNA	7
3.3.3. DNA markery	7
3.3.3.1. Mikrosatelity	8
3.3.3.2. RAPD	8
3.3.3.3. AFLP	9
3.3.4. Extrakce DNA	9
3.3.4.1. Metody	10
3.3.4.1.1. Jednoduché metody	10
3.3.4.1.2. Extrakce fenol - chloroformová	11
3.3.4.1.3. Iontová výměna (resin)	11
3.3.4.1.4. Adsorpce na silikát	12
3.3.4.1.5. Extrakce DNA pomocí magnetických částic	12
3.3.4.1.6. High - throughput extrakce	13
3.3.4.1.7. Kity	13
3.3.4.2. Extrakce DNA z lesních dřevin	13
3.3.4.3. Měřicí přístroj - Spektrofotometr	14
3.3.5. PCR (Polymerase chain reaction)	14

3.3.5.1. Metody PCR	15
3.3.5.2. Elektroforéza	17
4. MATERIÁL A METODY	19
4.1. Sběr vzorků	19
4.1.1. Barrandovská skála	19
4.1.2. Areál ČZU	20
4.3. Extrakce	20
4.3.1. Chemikálie	20
4.3.2. Přístroje	21
4.3.3. Příprava rostlinného materiálu	21
4.4. Postup extrakce DNA kitem DNeasy Plant Mini Kit	21
4.5. Hodnocení kvality a kvantity DNA	22
5. VÝSLEDKY	23
5.1. Konečná úprava vzorků DNA a jejich archivace	27
6. DISKUSE	28
7. ZÁVĚR	30
LITERÁRNÍ ZDROJE	31
INTERNETOVÉ ZDROJE	32

1. Úvod

Borovice jsou jeden z nejrozšířenějších jehličnanů severní polokoule. Mají mnoho tvarů a forem a mohou se vyskytovat od nížin po horská pásma, na rašeništích i v skalnatých půdách. Mnohé hybridizace dávají vzniknout poddruhům, jejichž vlastnosti a rozšíření se zkoumají díky genovým analýzám. Můžeme jejich postupné rozšíření sledovat po celé Evropě a to i s místy původu. V České republice se zkoumáním problematiky hybridizace borovic zabývá R. Businský z výzkumného ústavu Sylva Taroucy v Průhonicích.

Je mnoho principů a metod, které jsou v studiích využívány, ale pouze některé jsou vhodné pro extrakci DNA z lesních dřevin. Právě na borovici černé byly prováděny výzkumy, které pomohly modifikovat stávající metody tak, aby byly vhodné pro extrakci z lesních dřevin.

2. Cíl práce

Hlavním cílem mé práce bylo provést odběr vzorků a extrakci DNA pro budoucí genetický výzkum variability *P. nigra* ve vybraných lokalitách.

Dále bylo cílem zmapování různých metod analýzy DNA a způsobů extrakce DNA z lesních dřevin. Dalším bodem práce bylo stručně shrnout možnosti použití *P. nigra* ve výsadbách a hodnotu při úpravě životního prostředí.

3. Literární přehled

3.1. *Pinus*

Taxonomie dle Arnold et al. (1999):

Říše: *Planta*

Podříše: *Tracheobionta*

Oddělení: *Pinophyta*

Třída: *Pinopsida*

Řád: *Pinales*

Čeleď: *Pinaceae*

Rod: *Pinus*

Rod *Pinus* je v rámci rostlin nahosemenných (*Pinophyta*) nejrozsáhlejším rodem, obsahuje kolem sta druhů široce rozšířených na severní polokouli a v některých tropických a subtropických oblastech (Arnold et al. 1999). Karhu (2001) popisuje že, vývoj probíhal v polovině Jury, před 160 mil. let. V čeledi *Pinaceae* je 11 rodů a z toho je více než polovina druhů v rodu *Pinus*. V křídě se rod *Pinus* rozdělil do dvou podrodů – *Pinus*, tvrdé borovice, a *Strobus*, měkké borovice. Po diferenciaci se borovice šířily ve středních zeměpisných šířkách severní polokoule. Klimatické změny a horotvorné procesy vytvořily velkou různorodost a řídily rozdělení taxonů. Na konci eocénu došlo k zpestření a rozšíření rodu *Pinus*. V průběhu Pleistocénu se populace často přesouvaly v závislosti na ledových a meziledových obdobích. Klimatické kolísání mohlo sehrát významnou roli při zachování genotypů. V posledních 10 000 letech, od poslední doby ledové, se formovala současná struktura rozdělení borovic.

Borovice mají velkou ekonomickou hodnotu, pěstují se jako zdroj dřeva, celulózy. Jsou důležitou složkou ekosystému, v Evropě a Asii tvoří oblasti nejrozsáhlejších jehličnatých porostů na světě. Hranice rozšíření jednotlivých druhů jsou určeny genetickými, ekologickými a historickými faktory. Jedná se o morfologicky a fyziologicky variabilní druhy s výskytem od Arktidy až po tropické a subtropické oblasti střední Ameriky. *Pinus merkusii* lze dokonce nalézt i na jih od rovníku.

3.2. *Pinus nigra*

3.2.1. Historie, introdukce

Zara et al. (2007) uvádí, že borovice černá pochází z Balkánu, Pyrenejského a Apeninského poloostrova, ale také má původ na území severní Afriky a Malé Asie. Migrace a diferenciace *Pinus* probíhala v třetihorách podél moře Paratethys, a to nejspíše z východní Asie, kde se dají nalézt vývojově blízké taxony *Pinus*. Původně se některé poddruhy vyskytovaly i na našem území, ale zaledněním v průběhu čtvrtohor byla v severnějších oblastech (severnějších od států Středozemního moře) ochuzena dendroflóra. Velmi často se *P. nigra* vyskytuje ve smíšených porostech s jinými borovicemi (*Pinus heldreichii* Christ., *Pinus leucodermis* Ant., *Pinus sylvestris* L., *Pinus peuce* Griseb.), se kterými tvoří i hybridy.

Busincký (2008) uvádí, že introdukce do českých březových lesů probíhá od roku 1786 a to s předpokladem těžby pryskyřice, tento předpoklad se však nepotvrdil. Tento druh se stal jedním z nejčastěji pěstovaných a to díky své odolnosti, byl sázen na pustých místech, u hradů a na kopcích. Podařilo se tak zalesnit i místa, na kterých pokusy s jinými druhy selhávaly. V 19. století bylo pěstování *Pinus nigra* u nás podporováno německou i rakouskou školou. Také se předpokládá, že výsadba u nás pochází ze semen původních porostů v okolí Vídně. V druhé polovině minulého století (Berounsko 1988 – 1992) docházelo často k usychání, byl nalezen houbový patogen *Scleroderris lagebergii*, ovšem předpokladem je, že úhyn byl způsoben spíše dlouholetým suchem než patogenem. Dnes se jedná o druh, kterým je nahrazována *P. sylvestris* právě díky odolnosti vůči exhalacím a zasolení.

3.2.2. Vlastnosti

Hieke (2008) uvádí, že se jedná o původně horský až vysokohorský druh jehličnanu, který náleží do sekce *Pinus*, subsekce *Sylvestres*. Velmi tolerantní jehličnan a to ne pouze na složení půdy, ale také na klimatické podmínky, mrazuvzdorný. Nejradší má však vápenaté propustné půdy s dostatkem slunečního světla a tepla. Snáší dobře vedra, sucha a znečištěné ovzduší. Přirozeně se vyskytuje spíše ve vyšších polohách, ale je sázena i do nížin. Rozloha jejích porostů v ČR se odhaduje na 1000 – 2000 ha, které jsou převážně starší než 50 let (Acta Průhoniciana, 1999).

Hieke (2008) popisuje, že *P. nigra* může dorůstat až 40 m, koruna je tupě až deštníkovitě zakončená, větve má pravidelně přeslenité, ve stáří i nepravidelně. Mladé výhony jsou lysé, světle hnědé až oranžově hnědé. Pupeny má *P. nigra* vejčité až poněkud

cylindrické, pryskyřičné. Jehlice jsou po 2, světleji nebo temněji zelené, poměrně tuhé, na stromě vydrží 4 až 8 let, 8 – 12 cm dlouhé, 1 – 2 mm široké, rovné nebo zahnuté, okraje jemně zoubkované. Tato borovice má šišky téměř přisedlé, světle hnědé, otvírají se ve třetím roce. *P. nigra* disponuje silným kulovitým kořenem a má velmi hluboký kořenový systém. Dřevo je měkké, pružné a více pryskyřičnaté, než je tomu u *P. sylvestris*.

Množí se pomocí semen, která dozrávají v šiškách druhým rokem na podzim. Musí se sklídit hned při dozrání a přes zimu se uchovávají v chladu a temnu. Vyklíčit se nechávají na konci března a klíčivost se pohybuje mezi 76 – 90%. Kultivary jsou roubovány na podnož původního druhu nebo *P. sylvestris*.

3.2.2.1. Vybrané kultivary

Hieke (2008) popisuje kultivary: 'Aurea', který byl vyšlechtěn roku 1909, vyznačuje se pomalejším růstem a jehlice má zažloutlé, v druhém roce zelenají. Kultivar 'Balcanica' pochází z roku 1988 má polštářovitý růst, je zakrslý a typický temně zelenou barvou. 'Bonsai kalouš' je kultivarem z roku 1979, který je kompaktní. 20letý exemplář dosahuje výšky kolem 70cm. 'Bright Eyes' byl vyšlechtěn roku 1983, je zakrslý s dlouhými temně zelenými jehlicemi, zimní zbarvení pupenů má bělavé. 'Géant de Suisse' se vyznačuje keřovitým až stromovitým růstem, bujný, dorůstá 5 – 8m a byl vyšlechtěn v roce 1981. 'Strypemonde' je zakrslý keř s velmi robustním růstem. Jeho jehlice jsou matně zelené a zimní pupeny šedobílé. 1979. 'Zlatiborica' je kultivar z roku 1909 a její jehlice jsou zlatožluté.

3.2.3. Použití

P. nigra se používá jako náhradní dřevina, je velmi využívána v krajinářských úpravách a rekultivaci. Využívá se jako solitéra nebo do skupinových výsadeb. Je výrazná svou mohutnou korunou, ale také efektním kmenem, zvláště u některých kultivarů. V Americe je používána do stromořadí nebo jako ornamentální dřevina do zahrad. Je tudíž oblíbeným stromem mnohých zahrad a parků i u nás.

Hieke (1984) uvádí, že v Čechách se vyskytuje *P. nigra* 'Arnold' ve starších exemplářích hned v několika zámeckých parcích (Koloděje nad Lužnicí, Lužice u Tušimic, Postoloprty atd.). Velmi často se také vyskytuje *P. nigra* subsp. *nigra* var. *austriaca* (významné staré dřeviny hned ve třiceti zámeckých parcích; Černovice u Tábora, Dobříš, Chyše, Liblín atd.). Další velmi často používané jsou subsp. *caramanica*, var. *cebennesis*, ssp. *pallasiana*.

Hieke (1985) popisuje, že na Moravě je opět nejrozšířenější var. *austriaca*, dokonce mnohem používanější (vyskytuje se v 46 zámeckých parcích). Dále se zde pěstuje *Pinus nigra* subsp. *nigra* a subsp. *caramanica*.

3.2.4. Subspecie

Brusincký (2008) uvádí, že *P. nigra* je velmi komerčně oblíbeným druhem a je velmi často vysazovaná, ovšem bez ohledu na přirozené rozšíření. Na základě výzkumů byly zjištěny oblasti rozšíření jednotlivých skupin po době ledové.

Druh je rozdělen v Acta Pruhoniana (2008) do pěti základních poddruhů: *Pinus nigra* subsp. *nigra* (Subsp. *dalmatica* syn.) Původní oblasti výskytu jsou od východních Alp až po Balkán včetně Peloponéského poloostrova a Banátu (jihozápadní Karpaty). Jedinci tohoto poddruhu mají široce kuželovitou korunu, krátké jehlice 4 – 7 cm a malé šišky, 3 – 5 cm.

Pinus nigra salzmanii pochází z Jižní Francie, Španělska ale také z Maroka a Alžíru. Typický je stromovitý růst s úzce kuželovitou korunou, letorosty jsou oranžově žluté až červené, jehlice až 20 cm, tenké.

Pinus nigra calabrica (subsp. *laricio* syn.). Oblastí původního výskytu je Korsika, Sicílie a Apeninský poloostrov. Tento poddruh má kuželovitou korunu, která se ve stáří mění na plošší až deštníkovitou. Může měřit až 45 m, jehlice jsou do 20 cm dlouhé, zvlněné a mohou být zprohýbané zespoda.

Pinus nigra pallasiana (subsp. *caramanica* syn.). Původními oblastmi jsou Balkán, jižní Karpaty, Krym a severní a západní Turecko. Korunu má široce vejčitou až kuželovitou, dlouhé hustě rostoucí větve, jehlice jsou tlusté a tuhé až 18 cm dlouhé.

Pinus nigra fenzley, původní oblastí výskytu je jihovýchodní Turecko a Kypr.

3.3. Studium variability *Pinus nigra*

V dnešní době už variabilita není studována morfologicky, ale probíhají výzkumy na základě genetické analýzy. Proto jsou následující kapitoly věnovány této problematice.

3.3.1. DNA

Šípek (2010) uvádí, že deoxyribonukleová kyselina se nachází v každém organismu, je nositelem genetické informace. DNA obsahuje geny, neboli jednotky dědičnosti, které určují budoucí vlastnosti organismu. Genom je označením pro souhrn všech genů v buňce.

V roce 1869 švýcarský lékař Friedrich Miescher objevil v hnisu neznámou složitou složku. Získal ji pomocí vysrážení a označil jako „nuclein“, nukleová kyselina. Struktura DNA byla objevena v roce 1953 J. Watsonem a F. Crickem, kteří působili v Cambridge. Ovšem prvním průkopníkem ve zkoumání DNA je R. Franklinová, pomocí ozařování molekul DNA. Rentgenové paprsky přenesla na fotografický film a zaznamenala tak podobu DNA, neboť paprsky rentgenu se pohybují v přímkách a DNA se ohýbá, tak vznikl obraz pravidelně rozložených bodů (Graham, 2003). Dalšími průkopníky byli Arthur Kornberg a Severo Ochova, kteří v roce 1959 objasnili princip fungování nukleových kyselin. Roku 1978 dostali W. Arber, A. Nathans a H.O. Smith Nobelovu cenu, za objevení restrikčních enzymů.

DNA dělíme na dva typy podle toho, zda se vyskytuje v jádře (jaderná) nebo mimo něj (mitochondriální). V jádře se nachází ve formě chromozomů, chromozomální DNA. Počet chromozomů jehličnanů severní polokoule je obvykle 24. mtDNA se nachází v mitochondriích. Jedna buňka může obsahovat i tisíce kopií. Je pro každého jedince jedinečná, stejně jako jaderná DNA, ale vykazuje více individuálních rozdílů.

3.3.2. Analýza DNA

Studiem morfologické variability *P. nigra* se zabývali vědci již v roce 1879. Studie byly založeny na fenotypové podobnosti, geografickému výskytu. Balkánský poloostrov se vyznačuje největšími rozdíly v morfologii druhu, a proto většina výzkumů založených na molekulárních analýzách probíhala právě zde. Klasifikace jsou velmi rozdílné i dnes. V naší republice se morfologickou variabilitou zabývají v Průhonicích. Morfologie není zatím úplně jednoznačná a tak není možné posoudit, zda se výsledky morfologického pozorování shodují s výsledky molekulárních analýz.

Naydenov et al. (2006) popisují svůj výzkum, který byl podporovaný Bulharským ministerstvem zemědělství. Podařilo se určit migrační cesty některých skupin pomocí genetické studie založené na zkoumání mikrosatelitů chloroplastu a terpenové analýzy. Výsledky poukazují na to, že je velmi důležité vzít v potaz genetickou strukturu kvůli zachování variability tohoto druhu, což má vliv na jeho přizpůsobivost a kvalitu. Předpokládají, že s rozvojem nových genetických markerů dojde k odhalení ještě větší diference *P. nigra*.

3.3.3. DNA markery

Pančík (2011) uvádí, že se jedná o známé sekvence, které jsou základem pro studie populací a jejich mapování. Jedná se o variaci původní sekvence, způsobenou mutací.

Existuje mnoho typů, které jsou využívány v závislosti na velikostech zkoumaných fragmentů. Markery se využívají např. při hledání příčin dědičných chorob. Karhu (2001) popisuje markery jako základní nástroje pro populační studie a mapování jednotlivých druhů. Ideální genetický marker by měl být distribuován po celém genomu.

Markery jsou založené buďto na RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) nebo na PCR, ty mají velké spektrum využití. Mohou podávat informace o pořadí nukleotidů (sekvence) nebo mapovat celý genom (RAPD, AFLP) nebo pouze jeho části (PCR-RFLP, SSRs, SSCP).

3.3.3.1. Mikrosatelity

Karhu (2001) uvádí, že mikrosatelity mohou být jaderné (Simple Sequence Repeat) nebo chloroplastové (cpDNA SSR). Jedná se o sekvence složené z jednoho opakujícího se motivu 1 – 6 nukleotidů. Původně byl název microsatelit použit pouze pro opakující se motiv dinukleotidu cytosin – adenin/ guanin – tymin. Mikrosatelity byly nalezeny v každém živém organismu, u kterého byly zjišťovány. SSR jsou nejlepšími markery pro určení variability na populační úrovni zatímco chloroplastové mikrosatelity se využívají na úrovni druhů, někdy i vnitrodruhově.

Karhu (2001) uvádí, že u jehličnanů jsou nejběžnějšími sekvencemi GA/CT a CA/GT. Výzkumy na mikrosatelitech u *P. thunbergii* odhalily univerzální markery pro všechny jehličnany. Také tímto výzkumem byly objeveny mikrosatelity v mitochondriích jehličnanů.

Právě na borovicích byla studována evoluce mikrosatelitů. Pro správnou interpretaci funkce a významu je důležité znát jejich mutační vývoj. Existují dva možné mechanismy, které mohou vysvětlit vysokou mutační schopnost mikrosatelitů: Prvním je genová rekombinace při crossing-overu, druhou variantou je „sklouznutí“ během replikace.

Toth et al. (2000) uvádí, že v čeledi *Pinacea* je několik jednoduchých opakujících se sekvencí a tak je genom borovic tvořen mnoha opakujícími se sekvencemi. Tyto sekvence byly nalezeny ve všech oblastech genomu.

3.3.3.2. RAPD

(Random amplified polymorphic DNA) analýza, vytvářející fylogeneticky konzervované produkty, specifické pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA. Tato metoda je určena pro určení variability na populační a druhové úrovni, také se využívá k definici klonů. Bartoš (2007) uvádí, že polymorfismy RAPD DNA pochází

z bodové mutace. Tato technika umožňuje analýzu větší množství lokusů a kompletněji zhodnocuje genom ve srovnání s jinými markery. Její výhodou jsou nízké náklady, rychlost a požaduje malé množství DNA. Používá se k detekci rozdílů mezi rostlinnými populacemi.

3.3.3.3. AFLP

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů je metoda kombinující restriční štěpení DNA (technika RFLP) a amplifikaci DNA (technika PCR) (Graham 2003). Metoda je určena k zjištění variability chloroplastové DNA a definici haplotypů. Byla vyvinuta v 80. letech a využívá se v lékařství, pro identifikaci genů, které jsou zodpovědné za různá onemocnění. Principem je štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz za vzniku velkého množství fragmentů, které jsou rozděleny elektroforeticky dle velikostí. Podobnost spekter genomů takto vzniklých značí jejich příbuznost. Celý proces zahrnuje čtyři kroky: prvním je restrikce DNA, následuje preselektivní amplifikace, selektivní amplifikace a posledním krokem je elektroforetická separace.

3.3.4. Extrakce DNA

Ovesná et al. (2010) píše, že DNA je díky svým vlastnostem využívána jako analyt v celé řadě postupů. DNA je možno extrahovat z každého živé tkáně. Extrakční Metodu volíme na základě toho, z jakého materiálu chceme DNA extrahovat. Používá se celá řada metod a existuje celá řada modifikací, které mají proces urychlit nebo zlevnit. Několik let se již také používají tzv. kity, komerčně vyráběné soupravy, které jsou ovšem dražší než standardní postupy. Konečným krokem, který je různým metodám shodný je určení koncentrace DNA buďto spektrofotometrem nebo elektroforézou v agarovém gelu o malé koncentraci, kde se výsledky porovnávají se standardy.

U pevných látek či rostlinných buněk musí dojít k mechanickému rozmělnění drcením pletiva ve třecí misce za přítomnosti tekutého dusíku. Jiným mechanickým způsobem je protřepání na vortexu se skleněnými kuličkami.

Pančík (2011) popisuje, že celkově se DNA extrahuje mnohem složitěji z rostlinného materiálu, kvůli přítomnosti celulózy a šťáv ve vakuolách.

Všeobecný postup extrakce DNA začíná lýzou buněk: jejím prvním krokem je vždy mechanické uvolnění obsahu buněk, které se většinou provádí pomocí tekutého dusíku. Dále dochází porušení buněčných membrán pomocí detergentů (např. CTAB). Materiál by se měl používat čerstvý nebo zmražený v čerstvém stavu, to kvůli možnosti degradace NK.

K rozpadu struktury buňky dochází za pomoci proteáz, důležitá je také přítomnost chelatačních činidel (EDTA). Možný roztok, který se dá použít při izolaci DNA: 10 mM, Tris-HCl (pH = 7,5), 1,0 mM EDTA. Purifikace je odstranění proteinů, které mohou degradovat izolovanou NK, na jejich odstranění se používá nejčastěji proteáza K. Také musí dojít k odstranění RNA a to pomocí například pankreatické RNázy.

Běžně jsou při extrakci využívány tři přístupy: První je založen na vazbě DNA na kolonu potaženou vazebným povrchem s následným promýváním a druhý je založen na protřepávání DNA z roztoku do roztoku a finálním vysrážením. Třetí postup je kombinací dvou předcházejících. Dalším krokem po extrakci je PCR a předtím je nutné ověřit množství a kvalitu DNA (Pančík 2001)

3.3.4.1. Metody

Při izolaci nukleové kyseliny je třeba volit metodu v závislosti na požadované čistotě a množství finální nukleové kyseliny a na typu buněk, z nichž má být nukleová kyselina izolována (Pančík 2001).

Metody pro extrakci mohou být jednoduché techniky jako vysolování či srážení org. rozpouštědly nebo složitější a modernější způsoby (fenol-chloroformová, iontová výměna, silikát kolony, magnetické částice).

3.3.4.1.1. Jednoduché metody

Hänni et al. (1995), že metoda vsolování a vysolování využívá změny rozpustnosti DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku, s rostoucí koncentrací iontů rozpustnost roste (vsolování), po dosažení maxima rozpustnost molekuly klesá a tím se DNA z roztoku vysoluje. Nejčastěji používanou látkou je síran amonný, kvůli malým denaturačním účinkům.

Hänni et al. (1995) uvádí, že u etanolového srážení se k vysrážení DNA z roztoku používá etanol, při nízké teplotě (-20 °C) což zamezí degradaci molekul DNA. Lze použít i srážení při zvýšené teplotě, což umožňuje srážet DNA, bez vysrážení RNA. Doba inkubace je závislá na délce a koncentraci DNA. Poté se roztok ohřeje a vzniká mléčně zbarvený sediment (pelet). Bílou barvu v peletu mají soli, které byly vysráženy společně s DNA, ty odstraníme promytím 70% etanolem, tím získáme čistou DNA.

Hänni et al. (1995) alkoholové srážení za pomoci isopropanolu, při tomto postupu je, redukována modrá fluorescence na gelu pod UV zářením. Pokusy byla objevena i korelace

mezi množstvím fluorescence a inhibitory v PCR, čím je fluorescence méně, tím je menší i inhibiční aktivita.

Hänni et al. (1995) uvádí, že modifikované etanolové srážení je metoda, která je založená na protokolu alkoholového srážení. Výhodou této metody je, že je velmi rychlá protože eliminuje časově náročné kroky jako je např. přečištění (Kalmár et al., 2000). Odvíjí se z předchozí metody, ale dosahuje lepších výsledků a menšího výskytu inhibitorů pro PCR.

3.3.4.1.2. Extrakce fenol - chloroformová

Raclavský (2003) uvádí, že zaprvé musí proběhnout lýza buněk, ze kterých chceme DNA extrahovat. Do zkumavky je vložen vzorek a přidá se směs chloroformu, fenolu a izoamylalkoholu, chloroform se nemísí a tak dojde k rozdělení na dvě fáze, horní je vodná a dolní chloroformová. Obě dvě složky se musí promíchat, aby pomocí fenolu mohlo dojít k vysrážení proteinů, které jsou ve vodné fázi. Izoamylalkohol slouží k zvýšení rozpustnosti fenolu v chloroformové fázi. Následně dochází k odstředění pro oddělení fází, na rozhraní se objevuje tenká vrstva sražených bílkovin. Horní fáze nyní obsahuje nukleové kyseliny a je přenesena do nové zkumavky, tento krok se opakuje, dokud jsou přítomny proteiny. U rostlin se přidává i cetyltrimetylamonium bromid (CTAB) k odstranění polysacharidů. Dochází k další extrakci chloroformem s izoamylalkoholem, za účelem odstranění fenolu z roztoku. Při odstředění se ve zkumavce vytvoří pelet, sediment, která obsahuje jak nukleové kyseliny, tak i soli, které je třeba odstranit, a to tak, že sediment promyjeme 70% etanolem. Získaný roztok obsahuje nejenom DNA, ale i RNA, která se odstraní přidáním RNázy. Musí následovat opětne promytí fenol-chloroformem a DNA je vysrážena etanolem.

Tato metoda je časově náročná, ale je stále hodně využívána díky tomu, že je poměrně levná. Velkou nevýhodou je, že velkou roli hraje lidský faktor a tudíž dochází často k znečištění a nepřesnostem v následném měření. Naopak je vhodná v případě, že potřebujeme získat větší výtěžky.

Maniatis et al. (1982) uvádí, že se modifikace N-lauroylsarcosinem z roku 1982 se používá např. u archeologických výzkumů. Při této modifikaci se využívá 0,5% N-lauroylsarcosin, využívá se např. v lékařství.

3.3.4.1.3. Iontová výměna (resin)

Jedná se o metody, které fungují na principu iontové výměny mezi pevnou a kapalnou fází. Proces obvykle probíhá v kolonách, kde může probíhat výměna oběma směry. Principem je iontová interakce mezi molekulou DNA a nabitým iontoměničem. Iontoměniče můžeme

rozdělit na katexy a anexy, podle povahy přenášeného iontu. Katexy jsou ty látky, které přenášejí kationty, jedná se především o vlákna organických polymerů. Anexy jsou látky přenášející anionty a může tak být využita např. amoniová sůl. (lekarske.slovníky.cz)

Tato metoda je poměrně rychlá a jednoduchá. Je ideální pro vysoký výtěžek a čistotu získané DNA. Kity, které vycházejí z této metody, jsou zaměřeny spíše na rychlost provedení, ovšem na úkor výtěžnosti. Často jsou tyto metody využity k přečištění DNA získané z jiných postupů. Výhodou je, že efektivně odstraňuje možné inhibitory PCR.

3.3.4.1.4. Adsorpce na silikát

Brinker et al. (1998) uvádí, že pro tuto metodu se používaly přírodní materiály (křemelina), dnes se využívá silikagel, který má silně polární charakter, není toxický ani hořlavý a je velmi stabilní. Velikost použitých částic se pohybuje okolo 2 mm. Vlastnosti silikagelu ovlivňují fáze, které se na něj navazují.

Izolace DNA pomocí silikagelové membrány je založena na jednoduchém procesu vazby, promytí a uvolnění. Principem je taková vlastnost DNA, že při přítomnosti chaotropních solí (sloučeniny iontové povahy), snižujících strukturovanost vody (vodíkové můstky) dochází k denaturaci DNA. Nejčastěji je používán jodid sodný, ale také guanidium hydrochlorid nebo guanidium thiocyanát, pomocí kterého dochází k adhezi na silikát. Tudíž k lyzátu se přidá chaotropní sůl a suspenze silikátových částic, promícháváním pak dochází k tomu, že DNA ulpívá na částicích. Roztok je centrifugován a DNA je tak oddělena jiných látek, které zůstávají v roztoku. Roztok odstředíme a znova propláchneme chaotropními solemi s pufrém, na částicích tak zůstává čistá DNA, kterou uvolníme pufrém (TE, Tris nebo voda) bez obsahu chaotropních solí. Odstředíme a získáme roztok DNA.

Nevýhoda této metody je, že silikagel je stabilní v rozmezí 3 – 7,5 pH. Dalším omezením je teplota, která by neměla překročit 60 °C. Tato metoda je rychlá a nenáročná, což je její nespornou výhodou. Také nevyžaduje žádné zdlouhavé kroky a čistota získané DNA je značná. Jsou na ní založeny kity (Plant Mini Kit) a je součástí mnoha automatizovaných postupů.

3.3.4.1.5. Extrakce DNA pomocí magnetických částic

Húska et al. (2008) uvádí, že magnetické částice jsou 5 nm – 100 μm velké, kulovité útvary. Jejich jádro je tvořeno oxidy železa a povrch „opouzdrěn“ látkou schopnou vázat vlákna NK, což bývá anorganický oxid nebo organický polymer.

U této metody se přidává vazebný pufr obsahující PEG a NaCl, ten umožní vazbu DNA na magnetické částice. Částice se imobilizují a dochází k odstranění supernatantu, který obsahuje proteiny a buněčné zbytky. Pak probíhá uvolnění DNA promýváním, proběhne další imobilizace a tak se získá volná DNA. Existuje několik protokolů této metody, které se liší pouze např. použitým činidlem či sledu kroků.

Metoda je snadná, rychlá a DNA je čistá. Ovšem pro běžné použití v laboratořích je nutné použít automatizovanou metodu, která je finančně náročnější a výtěžek DNA není tak velký.

3.3.4.1.6. High - throughput extrakce

Jedná se o novou metodu, kterou uskutečnili Bastian et al. (1998) právě na druhu *Pinus nigra*. Byla vytvořena právě za účelem extrakce DNA z lesních dřevin. Získat kvalitní DNA ze stromů je obtížné a metody většinou nejsou vhodné pro jiné rostliny. Shepherd et al. (2002) uvádí, že tato metoda byla úspěšně použita pro extrakci z velkého množství vzorků. V jejich výzkumech bylo využito protokolu MM300 Mixer mill (Qiagen DNeasy 96 Plant Kit Handbook).

3.3.4.1.7. Kity

Na českém trhu je několik firem, které nabízejí kity pro práci s rostlinami. Pro ukázkou jsou uvedeny produkty české firmy Elisabeth Pharmacon. V současné době jsou v nabídce pro izolaci DNA tři základní řady kitů - základní souprava UltraClean Plant, která dostačuje na izolaci běžných vzorků rostlin, novější kit PowerPlant, kde je oproti kitu UltraClean Plant využito optimalizované bead beating technologie a kde jsou kontaminanty účinně odstraněny pomocí Inhibitor Removal Technology® (IRT). Souprava PowerPlant Pro je na trhu od roku 2012, v kitu je použit zkrácený a vylepšený protokol zajišťující 100 % odstranění inhibitorů.

Na stránkách firmy je k dispozici ceník, kde jsou uvedeny současné ceny některých produktů např. sto extrakcí kitem PowerPlant DNA Isolation Kit stojí 7 580 Kč. PowerPlant Pro stojí 4 576 Kč na 50 extrakcí a UltraClean Plant má cenu 3 207 Kč za 50 reakcí.

3.3.4.2. Extrakce DNA z lesních dřevin

Bastian et al. (1998) uvádí, že různé rostliny obsahují vysoké množství polysacharidů a mnoho typů sekundárních metabolitů, které ovlivňují izolaci DNA. Některé polysacharidy jsou známé inhibitory RAPD reakce, RFLP analýzy, klonování, vytváření genových bank a různé další techniky jsou také citlivé na kvalitu DNA. Příklady rostlin, které působí problémy

v souvislosti s izolací vysoce kvalitní DNA, jsou rododendrony, dub, a jilm. Kromě toho je rostlinný materiál zřídka uložen takovým způsobem, který zajišťuje kvalitu DNA. Pro mnoho studií je kvalitní DNA zásadní. Pokusy, které zahrnují vyšetření velkého počtu vzorků, vyžadují rychlejší metody, které spolehlivě přinášejí vysoce kvalitní DNA.

Existuje několik upravených protokolů, které jsou vhodné pro extrakci z dřevin. Např. Carlson/Qiagen byl upraven z protokolu pro získávání DNA z krve. Tento princip je založen na tom, že se DNA váže na anex, jedná se tedy o modifikaci metod Resin. Další metodou je upravená kyselá extrakce, která zanechá DNA v rozpustném stavu, zatímco ostatní látky jsou vysráženy.

3.3.4.3. Měřicí přístroj - Spektrofotometr

Obrázek 1: Spektrofotometr



Dostupné z: <http://www.dekonta.cz/sluzby-a-produkty/laboratorni-sluzby/vybaveni-laboratori.html>

Spektrofotometr se využívá pro měření koncentrace a absorbancí při různých vlnových délkách. Ovesná et al. (2010) uvádí, že při měření tímto přístrojem se využívá toho, že DNA absorbuje UV světlo od 210 do 500 nm. Ideální koncentrace pro další analýzu je 20 µl, vyšší koncentrace se ředí TE pufrem. Čistota izolované DNA se měří poměrem absorbancí při 260 a 280 nm. Ideální hodnota se pohybuje v rozmezí 1,7 - 1,9.

3.3.5. PCR (Polymerase chain reaction)

Tento princip objevil K. Mullis v roce 1985, v roce 1993 za něj získal Nobelovu cenu. Myšlenka je založena na principu, že každý reaktant (molekula DNA) vytváří dva objekty a každý z nich je spouštěčem nové reakce. K celé reakci je zapotřebí několika látek: jeden řetězec DNA (tzv. DNA-matrice), který se získává denaturací; krátké oligonukleotidy

(tzv. primery), které se syntetizují uměle; deoxyribonukleotidy (dNTP) a enzym, DNA polymeráza.

Bartoš (2007) uvádí, že PCR je snadná a rychlá replikace úseku DNA. Zahříváním a ochlazováním sekvence DNA společně s polymerázou a čtyř bází do směsi dojde k zahájení řetězové reakce. Úseky, které se mají amplifikovat, musí být označeny primery, které ohraničují konec a začátek. Tato metoda umožňuje provést analýzu DNA i z malého množství vzorku (Jones 2003). Celý proces probíhá s využitím enzymu polymerázy, který namnoží molekuly DNA. Tento enzym se získává z bakterie *Thermus aquaticus* (nejčastěji, neboť je odolná vysokým teplotám=termostabilní) a nese označení *Taq* polymeráza. Reakční prostředí je tvořeno pufrům s ionty hořčíku ve formě $MgCl_2$ nebo $MgSO_4$.

K celému procesu se využívá termocyklér, který je schopný střídat teplot. Zde dochází k amplifikaci ve třech krocích: Jako první probíhá denaturace, která rozvolňuje řetězce DNA (92-96 °C). Zaručuje, že budou odbourány struktury, které by mohly bránit primerům v napojení. Druhým krokem je přidání primerů k jednořetězové DNA, tato fáze se nazývá annealing (45-72 °C). Posledním krokem je extenze (72 °C) neboli syntéza nových řetězců. Jedná se o prodlužování vlákna a opakováním tohoto kroku probíhá samotná amplifikace. Na konci procesu je závěrečná extenze, kdy dochází k dosyntetizování produktů.

3.3.5.1. Metody PCR

První metodou je PCR-REA, také PRA nebo PCR-RFLP. Jedná se o základní reakci, která obsahuje dva primery, slouží k detekci jednoho specifického lokusu, jehož délka byla předem spočtena. Metoda nám umožňuje lokalizaci jakéhokoliv genu, všechny amplikony jsou stejně dlouhé a vyhodnocení výsledků se provádí elektroforeticky, poté dojde k jejich rozštěpení restriční endonukleázou a opět dojde k detekci elektroforeticky, za účelem vyhledávání polymorfismů v nukleotidech. Jedná se o metodu velmi jednoduchou, rychlou a vysoce citlivou. Ovšem její použití je možné pouze v případě, že se v daném lokusu se liší dvě alely tak, že jedna obsahuje restriční místo a druhá nikoliv (Bartoš 2007).

Hazula (2011) popisuje další variantu PCR, Alelově specifickou PCR. Provedení je možné pouze u dokonalého annealingu, dobře probíhá na místě, které nebylo ovlivněno mutací. Zde dochází k detekci pomocí alel, ta, která je amplifikovaná s větší účinností je bez mutace. Jeden z primerů je specifický pro obě alely a druhý je diskriminační.

Bartoš 2007 uvádí, že multiplex PCR je metoda, při které probíhá amplifikace více lokusů v jedné reakci PCR. Jsou přidávány jednotlivé dvojice primerů k již existující

strukturu. Na každém lokusu jsou dva primery, které musí mít stejnou teplotu annealingu. Velikosti amplikonů jsou pak odlišeny v elektroforéze. Existují i systémy, i kterých je možné amplifikovat i 12 lokusů současně.

Další metodou je kompetitivní PCR. Jedná se o základní metodu kvantitativní PCR. Hlavní použití je stanovení množství matrice u vzorku neznámého porovnáním se vzorkem známým. V současné době se ale tato metoda nahrazuje Real-Time PCR. Jsou dva možné způsoby provedení: První je použití dvou stejných primerů na dvě různé matrice, které produkují rozdílně dlouhé amplikony. Dochází ke kompetici mezi maticemi. U druhého způsobu použijeme různé primery pro cílovou sekvenci a sekvenci kompetující. Ke kompetici dochází na úrovni substrátu a enzymu. (Bartoš 2007)

SSLP-PCR, Simple sequence length polymorphism, princip založený na jednoduchých repetičích v rozmezí 2–10 bp. Vyskytují se až v 80kopiích a jejich počet se v důsledku mutací či rekombinací zvyšuje nebo snižuje. Počet repetič je odlišný u různých jedinců a tak se touto metodou dá zjistit příbuznost. Výsledkem procesu jsou různě velké amplikony, jež se dají separovat elektroforézou (Bartoš 2007).

Metody REP-PCR jsou založeny na analýze produktů PCR, které jsou komplementární s krátkými opakujícími se sekvencemi. Tyto sekvence jsou v celém genomu, tudíž se jedná o metody, které analyzují genom. Do opakujících se sekvencí se vloží primery, které jsou navrženy tak, že jejich 3' konce musí směřovat ven. Výsledkem jsou různě velké amplikony, které vypovídají o rozdílném umístění, vzdálenosti, uvnitř genomu. Jsou vyvinuty různé metody: FERP- fluoroforem zdokonalená interrepetitivní PCR, ALFA - automatická laserová fluorescenční analýza (Bartoš 2007).

Margulies et al. (2005) uvádí, že Emulzní PCR je metoda vyvinutá k hromadnému sekvencování DNA. Nejdříve se přidává jednořetězcová DNA, ke které se přidají adaptory, a ty ji imobilizují na povrchu pozitivně nabitých kuliček. Tyto kuličky s DNA jsou následně emulzifikovány s ostatními PCR komponenty a každá je zachycena ve vlastním „mikroreaktoru“, kde probíhá reakce. Vznikají tak amplikony s klonálním původem.

Poslední uvedenou metodou je Real-Time PCR. Jedná se o metodu, která umožňuje amplifikaci i zkoumání jejího výsledku v jedné zkumavce a to za pomoci světelného signálu z fluoroforů. Fluorofory jsou obecně jakékoli molekuly, které jsou v excitovaném stavu schopny emitovat fluorescenci (Bartoš, 2007). Nejčastěji se však jedná o heterocyklické uhlovodíky, které se navazují přímo na amplikon nebo na krátké sekvence nukleotidů, tzv.

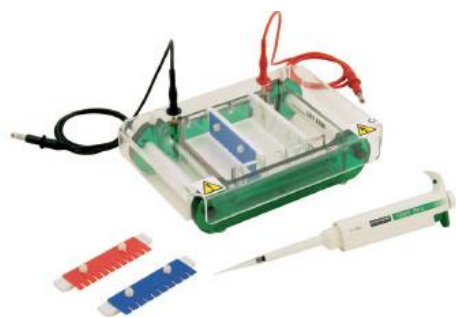
„hybridizační sondy“ na jejich koncích 3' nebo 5'. Tato metoda je oproti konvenčním metodám PCR jedinečná v tom, že můžeme sledovat aktuální průběh syntézy v každém cyklu a ne až v závěrečné fázi celého PCR procesu. Další výhodou této metody je, že dovoluje kvantifikaci vložené matrice a ne pouze kvalitativní vyhodnocení vzorku. Real-Time PCR má několik pracovních formátů. Davidson College (2003) popisuje DNA - SYBR® Green I, TaqMan® sonda, FRET, Beacons, Amplifluor™, Scorpions.

3.3.5.2. Elektroforéza

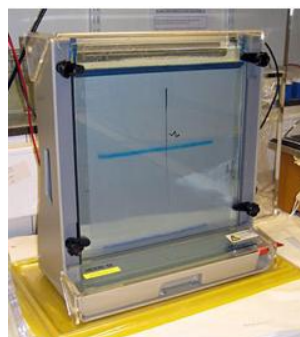
Pančík (2003 – 2011) uvádí, že principem elektroforézy je rozdílný elektrický náboj molekul v použité směsi. Molekuly DNA obsahují negativní náboj, a tudíž se pohybují na gelu směrem k pozitivní elektrodě. Pohyb je ovlivněn velikostí a tvarem částic, menší se pohybují rychleji. To může být zaznamenáno díky tomu, že gelové roztoky mají síťovou strukturu. K rozlišení jednotlivých velikostí jsou používány standardy, podle kterých se následně určí velikost sledovaných částic.

Ovesná et al. (2011) uvádí, že různé látky absorbují při různých vlnových délkách. Při 280 nm absorbují nejvíce proteiny, při 260 nm nukleové kyseliny a 230 nm mají absorpční maximum nízkomolekulární látky. Koncentrace se počítá z absorbance při 260 nm. Čistota DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se měří poměrem absorbancí 260/280 nm. Absorpční maximum při tomto měření mají bílkoviny a hodnoty by se měly pohybovat v rozmezí 1,7-1,9. Kontaminaci nízkomolekulárními látkami udává poměr absorbancí 260/230 nm. Absorpční maximum mají nízkomolekulární látky (fenol, EDTA) a optimální hodnota by měla být vyšší než 2.

Obrázek 3: Elektroforéza (agar)



Obrázek 2: Elektroforéza (polyakrylamid)



Dostupné z: <http://www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=elfo>

Jednou z možností je elektroforéza na agarovém gelu: agaróza je lineární polymer který se získává purifikací agaru. Je možno využít agarový gel v koncentracích 0,1- 3%, ale nejčastěji se využívá 1- 1,5%.

Druhou je elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Zkratka tohoto gelu je PAGE, vzniká polymerizací akrylamidu (C_3H_5NO). Nejčastější koncentrace je 6-10%, ale je možno využívat v rozmezí 4-12%. Na gelu se vytváří lineární řetězce, musí být přidáno malé množství bisakrylamidu, aby se mohly řetězce větvit (Pančík 2011).

4. Materiál a metody

4.1. Sběr vzorků

Pro sběr byly vybrány dvě oblasti na území hlavního města Prahy. Jedná se o místa s vysokým výskytem *P. nigra*. Samotný sběr proběhl na začátku července a poté na začátku října. Byly odebrány letorosty s pupeny, které mají dostatek mízy. Vzorky byly označeny a uloženy do mrazicího boxu.

4.1.1. Barrandovská skála

Obrázek 4: Barrandovská skála s označenými místy odběrů jednotlivých vzorků



Dostupné z: www.mapy.cz

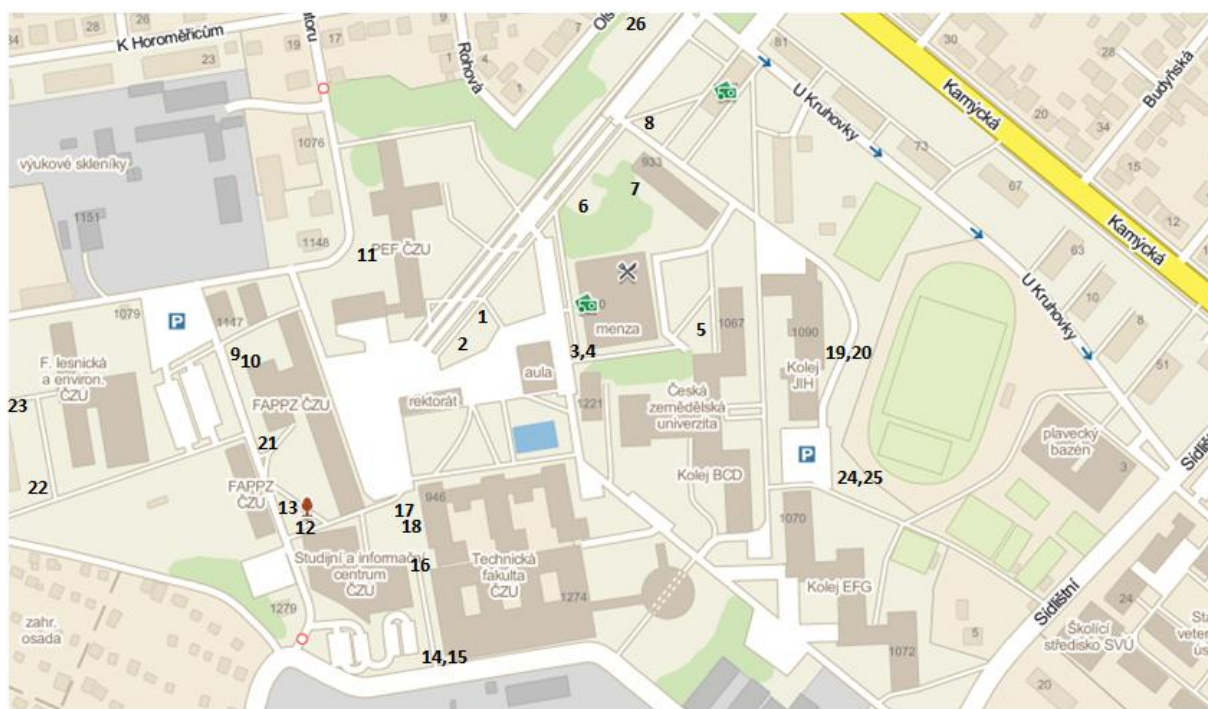
V této oblasti bylo sebráno šest vzorků, které byly označeny čísly 27 až 32.

Oblast Barrandovské skály pokrývá levý svah Vltavy v nadmořské výšce 200-300 m. Je zde vápencové podloží již z období prvohor, díky kterému byla tato oblast v roce 1982 vyhlášena přírodní památkou. Borovice černá je zde druhotně rozšířená a vyskytuje se v této oblasti v hojném množství.

4.1.2. Areál ČZU

Ve školním areálu bylo odebráno 24 vzorků, které byly označeny čísly 1 až 26, při sběru byla snaha pokrýt celou oblast. Areál se nachází v nadmořské výšce 300 m.n.m. stejně jako první oblast a tím rozdílem, že zde byly stromy cíleně vysázeny. Tudíž osazení bylo plánované a měla by zde být větší diverzita, neboť jedinci pocházeli z různých populací.

Obrázek 5: Areál ČZU s označenými místy odběrů jednotlivých vzorků



Dostupné z: <http://dendroflora.agrobiologie.cz/>

4.3. Extrakce

Extrakce DNA byla provedena z 32 vzorků borovice černé. Při postupu byl využit kit DNeasy Plant Mini Kit. Byly využity níže jmenované chemikálie a přístroje k dosažení výsledků v uvedeném postupu.

4.3.1. Chemikálie

Tekutý dusík

Etanol

Pufř AP1

RNáza

Pufř AP2

Pufr AP3/E

Pufr AW

4.3.2. Přístroje

Technokartell TK3S

Thermo block TDB-120

Bio TDB-120 BIOSAN

Eppendorf centrifuge 5415D

BIOrad PowerPac300

IMPLEN NanoPhotometer

4.3.3. Příprava rostlinného materiálu

Z odebraných vzorků byly odebrány pupeny a spodní části jehlic. Vzorky byly nakrájeny na malé části 1 - 2 mm, které byly odměřeny 0,2 g. Odměřené množství bylo dáno do zkumavek a uloženo na mraz pro další postup.

4.4. Postup extrakce DNA kitem DNeasy Plant Mini Kit

1) Prvním krokem extrakce na základě DNeasy Plant Handbook bylo mechanické rozrušení struktury buněk pomocí tekutého dusíku. Vzorky byly vloženy do třecích místiček a rozdrceny na prášek. Tento prášek byl následně odsypán (100 mg) do mikrozkušavek pro další postup.

2) Následně bylo přidáno 400 μ l pufru AP1 a následně 4 μ l RNázy (odbourá RNA ze vzorku). Tímto krokem byly rozrušeny rostlinné tkáně. Mikrozkušavky byly promíchány na vortexu.

3) Mikrozkušavky byly inkubovány po 10 min při 65 °C.

4) Do lyzátu bylo přidáno 130 μ l pufru AP2, byl promíchán a vložen na 5 minut do mrazicího boxu. Došlo k odbourání proteinů a polysacharidů.

5) Lyzát byl centrifugován 5 min při 14 000 ot. Některé rostlinné materiály mohou vytvářet příliš viskózní lyzáty nebo hodně sraženiny, a proto je tento krok velmi důležitý.

6) Lyzát byl následně pipetován do QIAshredder Mini spin column (lilac) umístěné v 2 ml zkumavce. Kit umožnil odstranění sraženin a buněčných zbytků, ale jen malé množství lyzátu projde skrz něj do zkumavky, aby zde vytvořilo pellet. Lyzát byl centrifugován, a to po dvě minuty při 14 000 otáčkách.

7) Dolní část zkumavky byla přenesena do nové bez narušení pelletu.

8) Bylo přidáno 1,5 objemu pufru AP3/E do lyzátu a promícháno pipetou. Je podstatné pipetovat pufr přímo do lyzátu a ihned zamíchat. Do pufru AP3/E musí být předem přidán etanol (96-100 %).

9) Bylo pipetováno 650 μ l roztoku z předchozího kroku do DNeasy Mini Spin Column, které byly umístěny v 2 ml zkumavkách, a to včetně sraženin, které se mohly vytvořit. Následovala centrifugace po 1 minutu při 8 000 otáčkách. Poté byla odstraněna spodní část zkumavky a krok se může opakovat se zbytkem roztoku v nové zkumavce.

10) DNeasy Mini Spin Column byly umístěny v nové 2 ml zkumavce a bylo přidáno 500 μ l pufru AW, do kterého byl předem přidán etanol. Následně proběhla centrifugace po 1 minutu na 8 000 ot. Roztok, který je ve spodní části zkumavky, byl vylit.

11) Bylo přidáno 500 μ l pufru AW do DNeasy Mini spin column a centrifugovalo se po 2 minuty při 14 000 ot., kvůli vysušení membrán. Tento krok sloužil k odstranění zbytkového etanolu, který by mohl způsobit interference v následujících reakcích. Centrifugace zajišťuje, že etanol se odstředí. Zkumavky i s obsahem byla odstraněna.

12) DNeasy Mini spin column byl přemístěn na novou 2 ml zkumavku a bylo pipetováno 100 μ l pufru AE přímo na membránu. Zkumavky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě a pak centrifugovány 1 minutu na 8 000 ot. Záleží na množství použitého pufru, pokud bychom ho použili méně, tak se sice zvýší koncentrace výsledné DNA, ale také to sníží celkový výnos.

13) Posledním krokem celého procesu extrakce bylo opakování předchozího kroku.

4.5 Hodnocení kvality a kvantity DNA

Vzorky DNA získané na základě předešlého postupu byly smíchány s 1,6 μ l vzorkového pufru (40% sacharóza a 0,25% bromfenolová a xylencyanolová modř). Následně byly pipetovány na 1,0 % agarózový gel a separovány při 120 V, elektroforetická separace proběhla na přístroji BIORad PowerPac300. K určení délky a stupně degradace byl využit standard GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus. Bylo nanášeno 0,5 μ l zásobního roztoku standardu rozpuštěného v 1,6 μ l vzorkového pufru a 9,5 μ l vody. Po 40 minutách byl gel vizualizován a dokumentován pomocí dokumentačního systému GelDocXR (BioRad).

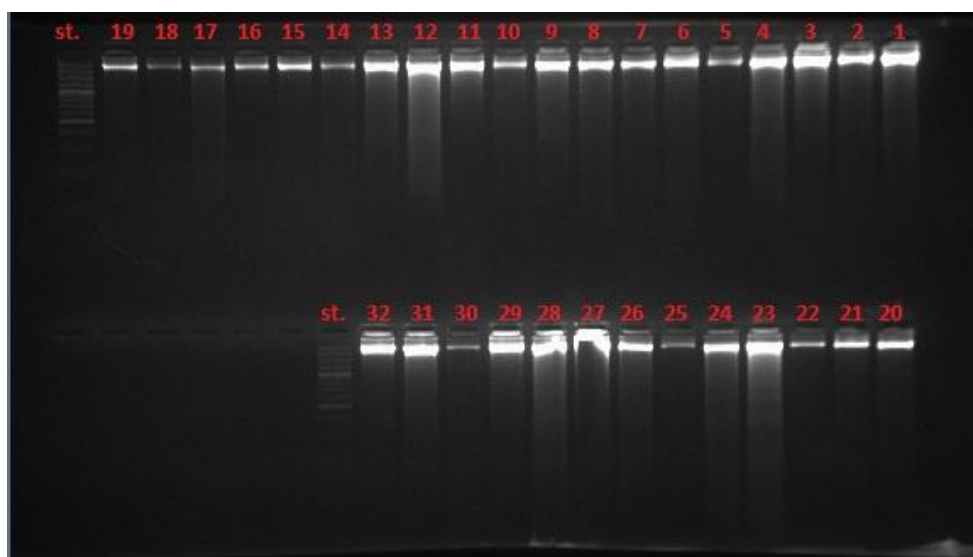
Koncentrace byla následně spektrofotometricky změřena a byla stanovena čistota DNA na přístroji Nanophotometer (Implen). Na základě tohoto měření bylo provedeno ředění vzorků na konečnou koncentraci 20 ng/μl. Následně byly vzorky zředěny. Vyrovnanost ředěné DNA byla opět ověřena elektroforeticky.

Přepočet všech statistických hodnot byl proveden v programu Microsoft Office Excel 2007 a grafy vytvořeny v Microsoft Office Word 2007.

5. Výsledky

Byla shromážděna kolekce 32 vzorků a z nich byla extrahovaná DNA pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). U všech vzorků byla ověřena vysokomolekularita ve srovnání s velikostním standardem GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Obrázek 6 dokumentuje, že všechny vzorky DNA vykazovaly srovnatelnou čistotu a dobrou vysokomolekularitu, jelikož velikost potenciálních fragmentů byla vyšší než 3 500 bp ve srovnání s velikostním standardem. Z vizualizace výsledků vyplývá, že u některých vzorků byla daná koncentrace DNA malá. Z obrázku je také patrné, že intenzita fluorescence byla velmi variabilní. Tato skutečnost byla potvrzená spektrofotometrickým měřením, výsledky měření jsou uvedené v tabulce 1. Spektrofotometrické měření bylo použito i k ověření čistoty vzorků DNA. Co se týče znečištění bílkovinami, tak v rozmezí optima (1,7 – 1,9) nebyly dvě hodnoty 1,375 u vzorku 25 a u vzorku 18 nebyla absorbance zjištělná. Maximální hodnota dosahovala 1,892 u vzorku č. 7 a průměr absorbance 260/280 byl 1,752. Nízkomolekulárními látkami byly kontaminovány vzorky 4, 11, 18, 19, 20, 25, což jsou čísla vzorků, jejichž hodnoty u absorbance 260/230 nebyly větší než 2. Průměrná hodnota u této absorbance byla 2,512, maximální dosáhla 3,6 u vzorku č. 26 a minimální hodnota 1,844 u vzorku č. 19.

Obrázek 6: Výsledky měření DNA



(Vlastní zdroj)

Na základě spektrofotometrického měření byl dále stanoven ředící faktor, který umožnil naředění DNA na standardní koncentraci 20 ng/μl. Elektroforetické testování vzorků po naředění prokázalo, že výsledky spektrofotometrického měření vykazují vysokou spolehlivost, jelikož intenzita fluorescence vzorků DNA se výrazně vyrovnala. Tuto skutečnost dokumentuje elektroforeogram na obrázku 7.

Tabulka 1: Výsledky jednotlivých měření

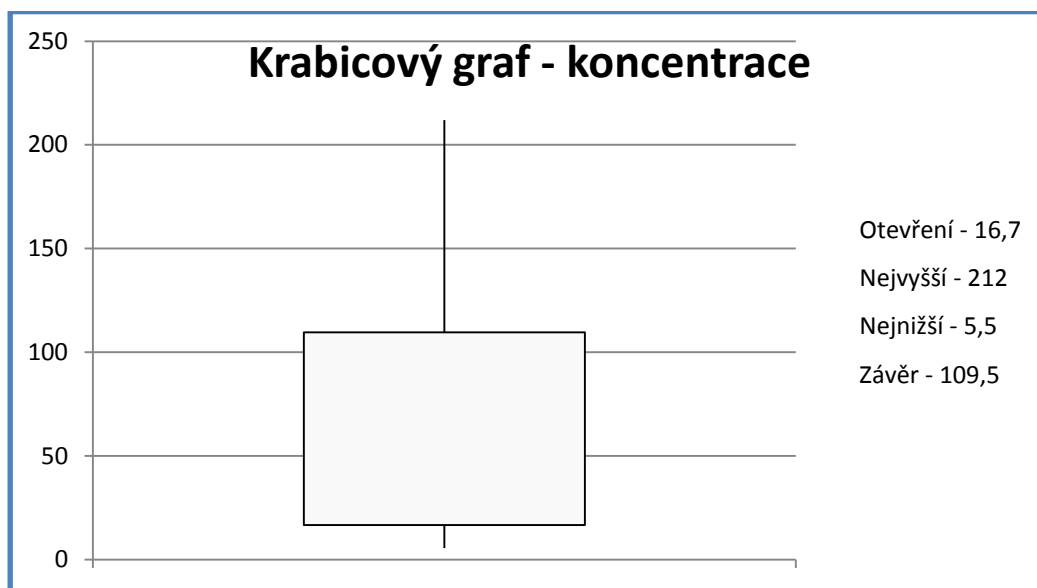
	c (ng/μl)	Výtěžnost (ng)	A 260/280	A 260/230	ředící faktor (20 ng/μl)
1	108	21600	1,815	2,512	5,40
2	54	10800	1,831	3,176	2,70
3	137	27400	1,803	2,228	6,85
4	62	12400	1,771	1,851	3,10
5	28	5600	1,867	2,24	1,40
6	94,5	18900	1,817	2,455	4,73
7	35	7000	1,892	2,917	1,75
8	64,5	12900	1,767	2,304	3,23
9	90,5	18100	1,866	2,549	4,53
10	45	9000	1,731	2,143	2,25
11	126	25200	1,806	1,946	6,30
12	141	28200	1,819	2,587	7,05
13	62,5	12500	1,786	2,193	3,13
14	20,5	4100	1,864	2,412	1,03

	c (ng/μl)	Výtěžnost (ng)	A 260/280	A 260/230	ředící faktor (20 ng/μl)
15	21,5	4300	1,792	2,867	1,08
16	18	3600	1,714	2	0,90
17	25,5	5100	1,7	2,125	1,28
18	9	1800	-	-	0,45
19	41,5	8300	1,729	1,844	2,08
20	52,5	10500	1,721	1,944	2,63
21	77	15400	1,812	2,962	3,85
22	12	2400	1,846	4,8	0,60
23	78	15600	1,793	2,328	3,90
24	33,5	6700	1,763	3,526	1,68
25	5,5	1100	1,375	-	0,28
26	27	5400	1,742	3,6	1,35
27	212	42400	1,804	2,494	10,60
28	112	22400	1,784	2,347	5,60
29	68,5	13700	1,803	2,322	3,43
30	8	1600	1,778	2	0,40
31	87,5	17500	1,786	2,215	4,38
32	62	12400	1,797	2,48	3,10

(Vlastní zdroj)

Průměrná hodnota bez vyloučení extrémních hodnot je 63,1 a s jejich vyloučením je 54,65. Hodnota směrodatné odchylky, po vyloučení extrémních hodnot (viz. krabicový graf), koncentrace DNA je 25,83 což naznačuje, že vzorky jsou stále dost variabilní. Toto potvrzuje hodnota variačního koeficientu 0,47.

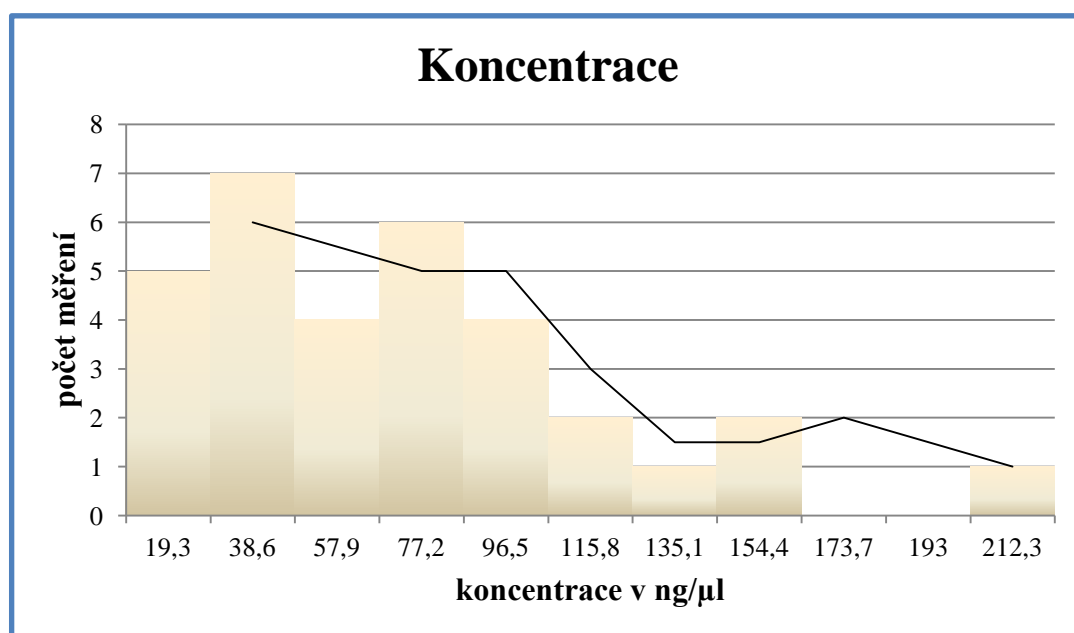
Obrázek 7: Krabicový graf



(Vlastní zdroj)

Krabicový graf ukazuje, které hodnoty jsou v souboru po vyloučení extrémních hodnot. Střední hodnota ohraničená hodnotami směrodatné odchylky určuje základní soubor, tudíž hodnoty mezi hodnotou koncentrace 16,7 a 109,5. Základní soubor obsahuje 23 hodnot, z kterých byly spočítány statistické ukazatele. Extrémní hodnota horní části grafu je 212 a spodní je 5,5.

Obrázek 8: Histogram koncentrace (ng/μl)

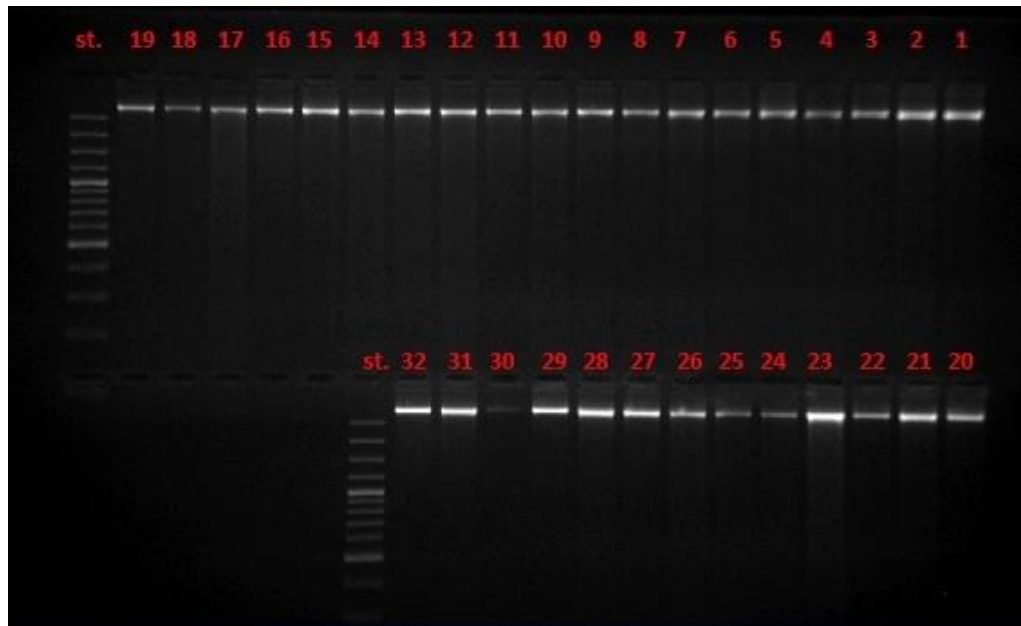


(Vlastní zdroj)

5.1. Konečná úprava vzorků DNA a jejich archivace

Vzorky, které nebyly ředěné, jsou stále viditelně slabší, ale rozdíl není už tak markantní. Došlo k vyrovnání koncentrací a tak by měly vzorky vykazovat přibližně stejné hodnoty. Vzorky byly uchovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

Obrázek 9: Výsledky ředění DNA



(Vlastní zdroj)

6. Diskuse

Práce byla realizována s cílem získat základní kolekci vzorků DNA ze dvou různých lokalit v rámci hlavního města Prahy. Extrakce kvalitní DNA je základem úspěšné molekulární analýzy.

Většina výzkumů se zabývá spíše rozšířením jednotlivých poddruhů *P. nigra* (Zara et al. 2007, Naydenov et al. 2006) a jejich rozlišením na základě genetické analýzy. Tudíž neuvádí přímo výtěžnost extrakce, ale soustředí se spíše na podobnosti a odlišnosti jednotlivých vzorků. V Čechách se výzkumem okrasných borovic zabývají na pracovišti VÚKOZ v Průhonicích.

Z přehledu literatury je patrné, že existuje celé spektrum různých metod extrakce DNA, liší se často náročností ať už časovou, hygienickou nebo technickou, zanedbatelná není ani stránka finanční. Z literární analýzy vyplývá, že optimálním přístupem extrakce DNA je využití minikitů. DNA byla proto v této práci extrahována kitem DNeasy Plant Mini Kit. Zvolená metoda poskytla dostatečné množství pro následné analýzy u všech odebraných vzorků. Průměrná výtěžnost 12,6 µg na 100 mg výchozího materiálu odpovídá i výsledkům, kterých dosáhl Shepherd et al. (2002) (12,4 µg). Ve své práci také popisují, že variabilita výtěžnosti byla poměrně značná, směrodatná odchylka činila 3 µg, také odpovídá uvedeným výsledkům (tab. 1). Grafy ukazují, že největší četnost výsledků výtěžnosti se pohybuje v rozmezí 3,9 až 7,7 µg, což je podprůměr, ovšem druhá největší četnost je lehce nadprůměrná 11,6 až 15,4 µg. Autoři uvádí, že značná variabilita ve výtěžnosti mohla být způsobena např. variabilními podmínkami původu vzorků (různé geografické lokace sběrných míst). Variabilitu v rámci této práce zřejmě nadmořská výška nezpůsobila, jelikož místa odběru jsou z hlediska nadmořské výšky stejná a nejsou ani geograficky vzdálená. Takže získanou variabilitu bych přisuzovala jak různosti jednotlivých výsadeb, tak časovým odstupům mezi sběry. Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výtěžnost, byla účinnost homogenizace biologického materiálu. V práci byla použita metoda homogenizace v třecí misce s využitím tekutého dusíku. Jehlice borovice byly mnohdy nepoddajné a často se je nepodařilo úplně homogenizovat. Z tohoto hlediska byly mnohem lepší juvenilní pupeny, kde bylo dosaženo větší homogenity.

Shepherd et al. (2002), kteří porovnávali metody s využitím čerstvého a zmraženého materiálu na rodu *Pinus* (listech) uvádí, že větší výtěžek získali ze vzorků zmrzlých. A při

maximálním zmrazení vzorků se výtěžek zvýšil až o 40% oproti použití čerstvého materiálu. Důvodem je nejspíš nedostatečné rozrušení buněčných stěn u čerstvých rostlin. Tato skutečnost nebyla v rámci této práce nikterak ověřena.

Podle DNeasy Plant Handbook se běžná výtěžnost u borovic pohybuje mezi 20 – 25 μg , což bylo zjišťováno u *P. sylvestris*. Z toho lze usoudit, že variabilita koncentrace uvnitř druhu je značná, toto koresponduje s výsledky Shepherd et al. (2002), Arnold et al. (1999) a Naydenov et. al. (2006).

Vzorky DNA byly podrobeny spektrofotometrické analýze s cílem zjistit koncentraci DNA a relativní obsah kontaminujících látek. Jak je diskutováno výše, byla zaznamenána značná variabilita mezi vzorky a to jak z hlediska koncentrace, tak i z hlediska čistoty. Právě příměs kontaminujících látek může vést ke zkreslení hodnoty koncentrace DNA (Ovesná et al. 2010, DNeasy Handbook 2006). Z výsledků ředění je patrné, že zjištěné hodnoty koncentrace zřejmě odpovídají realitě, jelikož došlo k výraznému vyrovnání intenzity fluorescence při elektroforetickém testu zředěných vzorků DNA. Do jaké míry kontaminanty ovlivňují průběh genetických analýz na bázi PCR nebylo ověřeno.

Již získané výsledky a zbylá DNA, která byla uložena v mrazicím boxu, bude do budoucna využita pro navazující genetickou analýzu struktury porostů.

7. Závěr

1) Za hlavní cíl práce bylo stanoveno vzorkování a inventarizace *P. nigra* ve dvou vybraných výsadbách v Praze. Bylo získáno 32 vzorků ze dvou lokalit v Praze.

2) Byla provedena úspěšná extrakce vysokomolekulární DNA vhodná pro PCR analýzy. Značnou variabilitu vzorků se podařilo vyrovnat pomocí spektrofotometrického měření a následného ředění.

3) Pro zvýšení homogenity vzorků DNA by bylo vhodné zařadit automatizovanou homogenizaci materiálu a pro extrakci DNA využít zejména mladých pupenů.

4) Měření mikroobjemovým spektrofotometrem vykazalo spolehlivé hodnoty, které byly nepřímo potvrzeny elektroforetickou analýzou primárních extraktů DNA.

Literární zdroje

- Arnold M. L., Bilger M. R., Burke J. R., Hempel A. L., Williams J. H. (1999). Natural Hybridisation: How Low Can You Go and Still Be Important? *Ecology* 80(2):371–381.
- Bastian, H., Csaikl, U. M., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz, F., Sperisen, C., Vornam, B., Ziegenhagen, B. (1998). Comparative Analysis of Different DNA Extraction Protocols: A Fast, Universal Maxi-Preparation of High Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 69 – 86.
- Brinker, J. A. (1998). Expansion within a Hostile Environment. *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis*. Volume 44 - Issue 4: 378–379
- Businský, R. (2008). THE GENUS PINUS L., PINES: Contribution To Knowledge. *Acta Pruhoniana* 88. Str: 126. Isbn: 978-80-85116-60-1
- Graham, I. (2003). *Genetika*. Computer Press. 32str., isbn: 80-7226-941-0
- Hänni, C., Laudet, V., Sakka, M., Begue, A. and Stehelin, D. (1990). Amplification of Mitochondrial DNA Fragments from Ancient Human Teeth and Bones. *C. r. Acad. Sci.* 310 (3): 365-370
- Hieke, K. (1984). *České Zámecké Parky A Jejich Dřeviny*. Státní zemědělské nakladatelství . str.: 460. ISBN: 07-036-84
- Hieke, K. (1985). *Moravské Zámecké Parky A Jejich Dřeviny*. Státní zemědělské nakladatelství. Str.: 307. ISBN: 07-107-85
- Hieke, K. (2008) *Encyklopedie jehličnatých stromů a keřů*. CPRESS. Str: 248. ISBN: 978-80-253-1901-3
- Húska, D., Baloun, J., Trnková, L., Adam, V., Kizek, R. (2008). Využití Paramagnetických Částic pro Izolaci mRNA. *CHEMagazín*, č.3, ročník XVIII.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Margulies, M., Eghold, M. et al. (2005). Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature*, 437(7057): 326-327
- Naydenov, K. D., Tremblay, F.M., Fenton, N.J., Alexandrov, A. (2006). Structure of *Pinus nigra* Arn. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 562 – 574

- Jones, S., B. van Loon. (2003). Genetika. Portál. 180str., ISBN: 80-7178-708-6
- Kalmár, T., Bachrati, C. Z., Marcsik, A. and Raskó, I. (2000). A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res.* 28: e67
- Karhu, A. (2001). Evolution And Applications Of Pine Microsatellites. Department of Biology, University of Oulu.
- Ovesná, J., Hodek, J. (2010). Metody Extrakce DNA z Čerstvého Plodu Papáji a z Kandované Papáji. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 22str., ISBN: 978-80-7427-063-5
- Qiagen (2006). DNeasy Plant Handbook. Qiagen.
- Shepherd, M., Cross, M., Stokoe, R. L., Scott, L. J., Jones, M. G. (2002). High-Throughput DNA Extraction From Forest Trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 425 – 425.
- Toth G., Gaspari Z., Jurka J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genetical Research* 10:967– 981.
- Výzkumný Ústav Okrasného Zahradnictví Průhonice. (1999). Studium Domácích A Introdukovaných Druhů Rodu Pinus. *Acta Průhoniciana* 68. Str.: 221. Isbn: 80-85116-19-7.
- Zara, A. R., Dodd, R. S. (2007). Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular Ecology* 16: 723 – 736

Internetové zdroje

- Bartoš, M. Základy farmakogenomiky [online]. 2007 [cit. 22.3.2012]. Dostupné z <<http://www.farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=92>>
- Davidson College. Real-Time PCR: the TaqMan® Method [online]. 2003 [cit. 26.3.2012]. Dostupné z <<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimemepcr.htm>>
- Elisabeth Pharmacon. Izolace DNA a RNA z rostlin [online]. [cit. 7.4.2012]. Dostupné z <<http://laboratore.elisabeth.cz/izolace-dna-a-rna-z-rostlin.html>>

- Haluza, R. Stručný teoretický úvod do molekulární genetiky a jejích metod [online]. 2011 [cit. 22.3.2012]. Dostupné z <<http://www.gyn-test.cz/testy-uvod-do-molekularni-genetiky/#htm-prima-diagnostika-alelove-specificka-pcr>>
- Maxdorf. Lékařské slovníky [online]. 2008 [cit. 7.4.2012]. Dostupné z <<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/anexy>>
- Pančík, P. SEPARÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN [online]. 2003 - 2011 [cit. 22.3.2012]. Dostupné z <<http://www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=pcr>>
- Raclavský, V. Metody molekulární genetiky. [online]. 2003 [cit. 22.3.2012]. Dostupné z <<http://biologie.upol.cz/metody/>>
- Šípek, A. DNA – Deoxyribonukleová kyselina [online]. 2010 – 2012 [cit. 27.3.2012]. Dostupné z <<http://www.genetika-biologie.cz/deoxyribonukleova-kyselina>>