

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE



Zhodnocení genetické variability barvínku menšího (*Vinca minor*) na zaniklé vesnici Svídna

Evaluation of genetic variability of lesser periwinkle (*Vinca minor*) at the deserted medieval village Svídna

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

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

Bakalantka: Tereza Pospíšilíková

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Tereza Pospíšilíková

Aplikovaná ekologie

Název práce

Zhodnocení genetické variability barvínku menšího (*Vinca minor*) na zaniklé vesnici Svídna

Název anglicky

Evaluation of genetic variability of lesser periwinkle (*Vinca minor*) at the deserted medieval village Svídna

Cíle práce

Cílem práce je zpracovat literární rešerši a zároveň provést genetické analýzy DNA ze vzorků sebraných na vybrané lokalitě Svídna a ověřit možnosti uplatnění markerovacího systému SSR (simple sequence repeats) u druhu *Vinca minor*.

- 1) Zhodnocení morfologické variability
- 2) Zhodnocení genetické variability

Metodika

- 1) Literární rešerše
- 2) Izolace DNA a PCR analýzy
- 3) Zpracování dat a statistické vyhodnocení výsledků
- 4) Diskuze a závěry

Doporučený rozsah práce

Minimálně 25 normostran textu bez příloh

Klíčová slova

Vinca minor, mikrosatelity, genetická variabilita

Doporučené zdroje informací

- Bhumika S., Niroj K. S., Sushil K., Sabhyata B. 2007: Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molecular variation in the medicinal plant Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Plant Science* 172:441–451.
- Darcy A.J., M.C. Burkart. 2002. Allelopathic potential of *Vinca minor*, an invasive exotic plant in west Michigan forests. *Bios* 4: 127-132
- Hlásná-Čepková P., Karlík P., Viehmannová I., Müllerová V., Šmejda L., Hejčman M. 2016. Genetic and leaf-trait variability of *Vinca minor* at ancient and recent localities in Central Europe. *Biochemical Systematics and Ecology* 64: 22-30
- Moeller S., Wöhrmann T., Huettel B., Weising K. 2015: Development of 18 Polymorphic Microsatellite Markers for *Vinca minor* (Apocynaceae) via 454 Pyrosequencing. *Applications in Plant Sciences* 3: 1500015. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1500015>.
-

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Mgr. Vladimíra Jurasová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Ing. Petra Hlásná Čepková, PhD.

Elektronicky schváleno dne 5. 4. 2017

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 5. 4. 2017

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 09. 04. 2017

Prohlášení

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

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

V Praze

.....

Poděkování

Chtěla bych touto cestou velmi poděkovat mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Vladěce Jurasové, Ph.D. za předané vědomosti, za zaučení v laboratoři a trpělivost. Velké díky patří mé konzultantce Ing. Petře Hlásné Čepkové Ph.D. za všechny její čas, který mi věnovala a za zkušenosti a rady, které mi předala. Oběma děkuji za velmi příjemnou spolupráci. Dále také děkuji Mgr. Petru Karlíkovi za jeho čas a za cenné rady a informace, které mi sdělil. Děkuji za finanční podporu grantů ČZU CIGA (20144207) a IGA (20164224).

Abstrakt:

Barvínek menší (*Vinca minor*) je stálezelený polokeř patřící do čeledi toješťovitě (*Apocynaceae*), který byl po staletí pěstován jako okrasná a léčivá rostlina. V této bakalářské práci byla zjišťována genetická variabilita populace b. menšího na zaniklé středověké vesnici Svídna pomocí dvanácti ověřených mikrosatelitových sekvencí DNA. Výsledky genetických analýz byly porovnávány s daty morfometrických měření. Byly potvrzeny výsledky nedávných výzkumů, že b. menší na středověkých zaniklých lokalitách vykazuje širší charakter listů než b. menší na později vzniklých lokalitách. Mezi testovanými vzorky z lokality Svídna nebyly zjištěny rozdíly na úrovni testovaných mikrosatelitových markerů. Nebyla zjištěna genetická variabilita b. menšího na studované lokalitě Svídna, což by mohlo být argumentem pro jeho nepůvodnost v ČR a podnětem dalších zkoumání.

Klíčová slova: barvínek menší, mikrosatelity, genetická variabilita, morfometrika listu

Abstract:

Lesser periwinkle (*Vinca minor*) is an evergreen subshrub belonging to the *Apocynaceae* family, which has been planted for centuries as an ornamental and medicinal plant. We studied a genetic variability of population of *Vinca minor* at the deserted medieval village Svídna with help of twelve verified microsatellite sequences of DNA. The results of the genetic analysis were compared to morphometric measuring. The recent study proved, that *Vinca minor* at medieval deserted localities is characterised by wider laminae than *Vinca minor* at the recent localities and this bachelor thesis confirms that. Differences were not established among tested samples on the level of the tested microsatellite markers. The genetic variability of *Vinca minor* was not established at studied locality of Svídna, it could mean that it is not autochthonous in the Czech Republic and it is a reason for studying the origin.

Keywords: lesser periwinkle, microsatellites, genetic variability, leaf morphometry

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce	9
3	Literární přehled.....	10
3.1	Botanický popis druhu <i>Vinca minor</i>	10
3.2	Rozšíření <i>Vinca minor</i>	10
3.3	Taxonomie a příbuzné druhy.....	12
3.4	Rozmnožování druhu <i>Vinca minor</i>	13
3.5	Genetická diverzita druhu <i>Vinca minor</i> a příbuzných druhů	13
3.6	<i>Vinca minor</i> využití.....	16
3.7	Zaniklá středověká vesnice Svídna	17
3.8	Mikrosatelity	18
3.9	PCR	19
4	Metodika	21
4.1	Charakteristika místa sběru vzorků	21
4.2	Sběr a příprava materiálu	21
4.3	Morfometrie.....	22
4.4	Genetika.....	23
4.4.1	Extrakce DNA	23
4.4.2	Mikrosatelity	24
4.4.3	PCR	25
4.4.4	Příprava vzorků na fragmentační analýzu.....	25
5	Výsledky práce.....	26
5.1	Genetické analýzy	26
5.2	Morfometrické analýzy	27
6	Diskuze.....	29
7	Závěr	30
8	Literatura	31
9	Seznam obrázků a tabulek.....	34
10	Přílohy	35

1 Úvod

Území střední Evropy je osidlováno již od neolitu (cca 5000 př. n. l.). V této době došlo k rozvoji chovu domácích zvířat, pěstování plodin a později výrazně krajinu pozměnilo i poznání využití ohně, dobývání minerálů a používání kovových nástrojů (Lipský 1999). K dalším výraznějším zlomům v intenzitě využívání krajiny došlo na konci středověku, pak během průmyslové revoluce a v 50. - 70. letech 20. století, kdy došlo k zintenzivnění zemědělství, používání umělých hnojiv a zjednodušení struktury krajiny vlivem kolektivizace (Löw, Míchal 2003). Lidé zmíněnými zásahy do krajiny nezměnili jen její podobu a fungování, ale ovlivnili tak třeba i rozšíření některých druhů. Jedním z rostlinných druhů, který byl ovlivněn antropogenními vlivy, je barvínek menší (*Vinca minor*). B. menší je polokeř patřící do čeledi toješťovitě (*Apocynaceae*). B. menší byl po staletí pěstován jako okrasná a léčivá rostlina. Jeho přirozený původní areál není znám, ale již od římských dob byl šlechtěn v oblasti mediteránu. Díky této znalosti se v dnešní době využívá jako fytoindikátor bývalých středověkých osad Římanů. B. menší byl i na naše území z velké části pravděpodobně zavlečen Římany. V našich podmínkách stejně tak jako v ostatních státech střední Evropy není většinou schopný se rozmnožovat generativně, pouze vegetativně zakořeňováním dlouhých oddenků. V minulosti byla již studována genetická variabilita jeho příbuzného druhu, barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus*) (Shokeen et al. 2007) a následně i samotného b. menšího, jehož vzorky byly sebrány převážně v Německu (Möller 2015). Na území České republiky genetickou variabilitu studovali a následně i porovnali s variabilitou tvaru listů Hlásná Čepková et al. (2016), na což tato bakalářská práce navazuje.

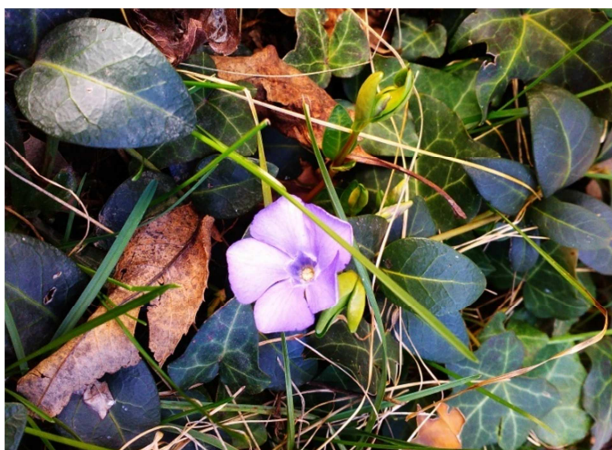
2 Cíle práce

- Shrnout dosavadní poznání o výskytu, šíření, morfologické a genetické variabilitě barvínku menšího.
- Zhodnocení morfologické variability barvínku menšího na lokalitě Svídna.
- Ověření možnosti aplikace markerovacího systému mikrosatelitů (SSR, simple sequence repeats) včetně optimalizace protokolu izolace DNA u barvínku menšího.
- Zhodnocení genetické variability barvínku menšího na lokalitě Svídna.

3 Literární přehled

3.1 Botanický popis druhu *Vinca minor*

Barvínek menší (*Vinca minor*) (Obrázek 2) je vytrvalá, při bázi dřevnatějící, lysá bylina s tenkým válcovitým plazivým až 70 cm dlouhým oddenkem. Kořenuje z nodů, ze kterých dále vyrůstají často sterilní, poléhavé lodyhy. Tyto lodyhy většinou nenesou květy. Mohou být přímé, vystoupavé nebo také poléhavé. Jsou řídky pokryty krátkými chlupy. Nesou krátce řapíkaté podlouhle kopinaté až eliptické, kožovité, stálezelené listy (15-45 x 5-2,5 mm) (Dostál 1989, Slavík 2000). Na svrchní straně jsou lesklé, tmavě zelené, na spodní světlé a matné. B. menší kvete fialově modrou, světle modrou, červenorůžovou a vzácně může kvést i bílou barvou. Jeho květy vyrůstají jednotlivě z úžlabí horních listenů na dlouhých stopkách.



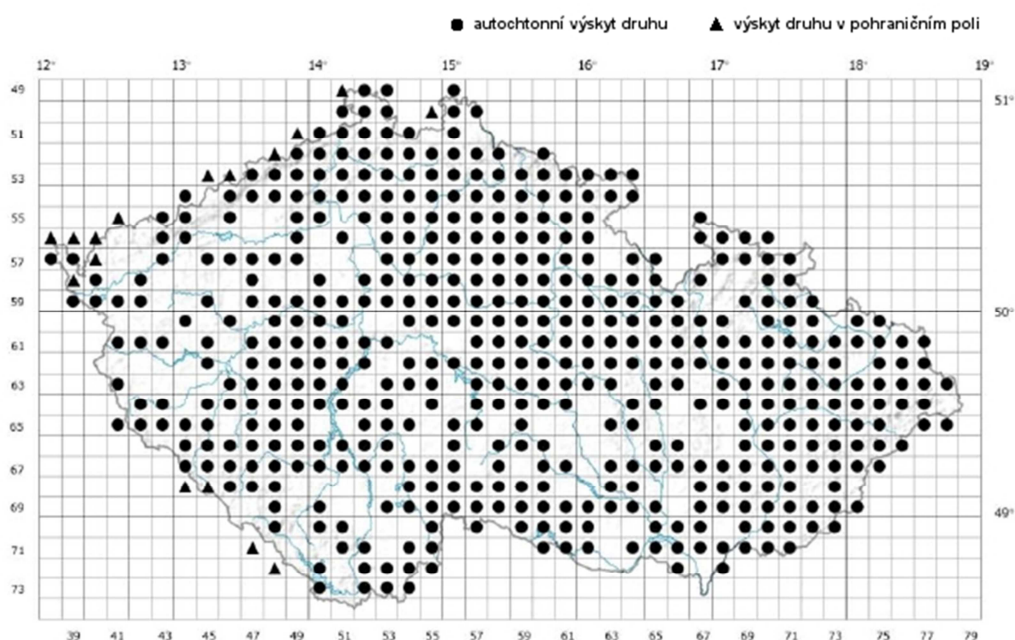
Obrázek 1 Barvínek menší (*Vinca minor*)

Kalich má nálevkovitě rozšířený tvar s pěti úzkými cípy. Koruna je řepicovitá s úzkou, nálevkovitě rozšířenou trubkou cca 1 cm dlouhou s pěti šikmo obkopinatými až šikmo obvejčitými tupými cípy (cca 1,2 cm dlouhé). Plodem je 15-21 mm dlouhý kuželovitý měchýřek s 2-3 úzkými, hnědými bradavčitými semeny (Dostál 1989, Slavík 2000).

3.2 Rozšíření *Vinca minor*

V České republice je těžištěm výskytu b. mešího oblast od východní Moravy do severních Čech a od Českého krasu přes Podbrdsko do Podují (Slavík 2000). Dále

se vyskytuje na většině území ČR, což je patrné z mapy (Obrázek 2). Z vertikálního pohledu je podle Slavíka (2000) rozšířen od pahorkatin do podhůří (max.: Černá Studnice, 850 m n. m.), podle Lhotské (1985) se vyskytuje již od nížin. B. menší obývá všechny fyto geografické okresy. Na našem území se jeho pravděpodobně autochtonní populace vyskytují ve smíšených lesích, luzích, křovinách a na zarostlých skalách (Lhostká 1985, Kubát 2002), konkrétněji v dubohabřinách a bukových lesích (Slavík 2000).

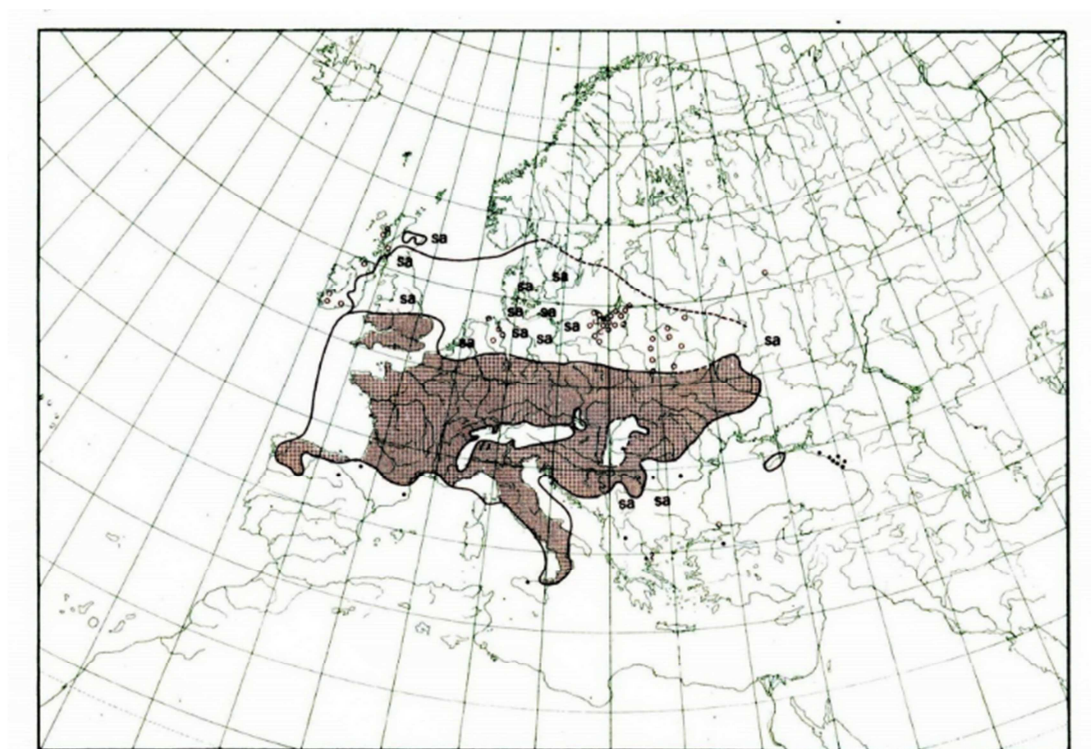


Obrázek 2 Rozšíření *Vinca minor* na území ČR (Slavík 2000).

V Evropě je původní areál rozšíření b. menšího díky starobylým kulturám, které ho pro jeho léčivé a okrasné vlastnosti šířily napříč Evropou, jen těžko k rozpoznání. Jeho výskyt je ve spoustě zemí jako např. Anglie, severní Německo, Srbsko nebo v oblastech alpských údolí nepůvodní (Meusel et al. 1978a). Předpokládané rozšíření b. menšího na území Evropy dle Meusela et al. (1978a) je patrné z mapy (Obrázek 3). Také podle Slavíka (2000) je primárním areálem Evropa (od SZ Pyrenejského poloostrova, přes Francii, Apeninský poloostrov, střední Německo, Českou republiku po sever bývalé Jugoslávie), s těžištěm v submeridionálním pásu, což potvrzuje třeba i Fleming (2004).

Z ekologického hlediska roste b. menší na úživných půdách s vyšším obsahem dusíku a na čerstvých půdách, které jsou slabě kyselé až slabě bazické

(hlavně na vápencích a opukách). Nejvhodnější podmínky mu poskytují listnaté až smíšené lesy a stanoviště blízké lesům (Ellenberg 1986, Stolz 2013).



Obrázek 3 Rozšíření *Vinca minor* na území Evropy (Meusel et al. 1978b).

3.3 Taxonomie a příbuzné druhy

B. menší je stálezelený polokeř patřící do čeledi toješťovitě (*Apocynaceae*) (Khanaviet al. 2010). Čeleď toješťovitě je zastoupena vytrvalými bylinami, polokeři a keříky. V tropických oblastech se vyskytuje hlavně ve formě stromů, keřů a dřevinných lián. Listy rostlin této čeledi jsou celokrajné, jednoduché a obvykle kožovité, sukulentní nebo stálezelené. Květy jsou 4-5 čtné. Čeleď čítá zhruba 2000 druhů, z čehož se většina nachází v tropech, menší část v subtropích a několika druhy zasahuje i do temperátního pásu. Druhy této čeledi jsou zajímavé tím, že obsahují kaučuky, různé alkaloidy a kardiotonické glykosidy, které se využívají v lékařství nebo třeba jako smrtelně jedovaté šípové jedy (Slavík 2000).

Barvínek menší patří do rodu barvínek (*Vinca*). V Evropě a západní Asii se vyskytuje sedm druhů barvínků, přičemž v České republice je rod barvínek zastoupen pouze dvěma druhy (b. menší a b. větší (*V. major*)) (Daníhelka 2012). Do Nové květeny ČSSR byl zařazen ještě třetí druh b. bylinný (*V. herbacea*). Ten je

zajímavý tím, že jako jediný barvínek má opadavé listy (Dostál 1989). Kromě původních či zavlečených jedinců rodu barvínek je v ČR často pěstován oleandr obecný (*Nerium oleander*), který patří též do čeledi toješťovité (Novák, Skalický 2009).

3.4 Rozmnožování druhu *Vinca minor*

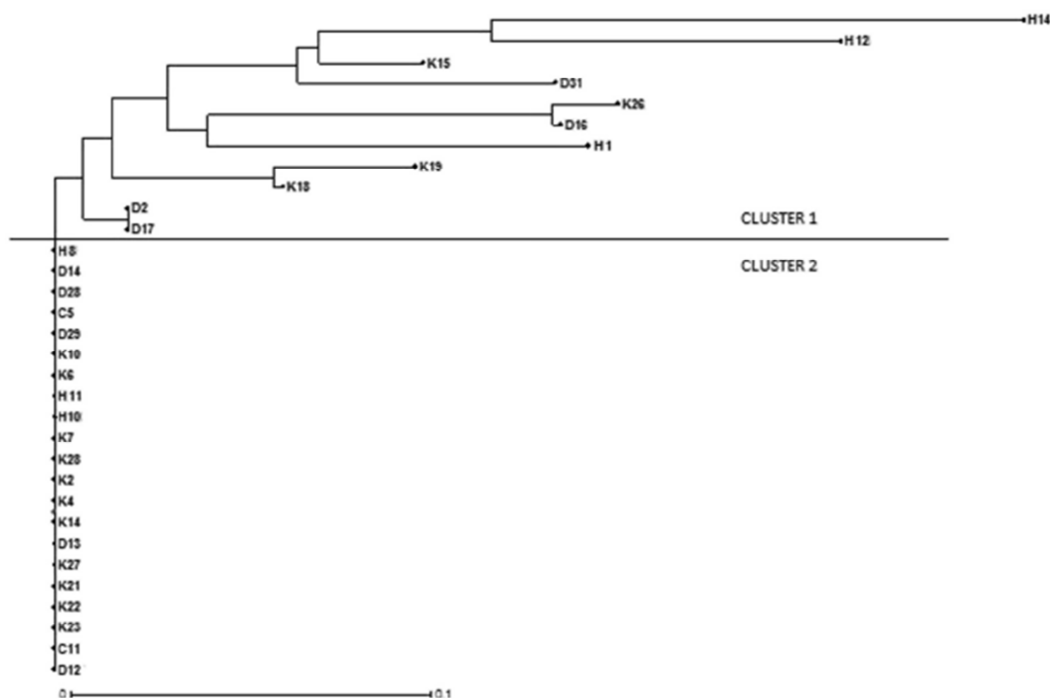
Ve střední Evropě se b. menší rozmnožuje hlavně vegetativně a to zakořeňováním dlouhých oddenků (Lhotská et al. 1985, Hlásná Čepková et al. 2016). Ve svém původním areálu, tedy mediteránu se rozmnožuje převážně generativně (Prange 1996, Hlásná Čepková et al. 2016). Je to alogamní rostlina, ke vzniku semen tedy dochází pouze po cizosprašení (Lipow, Wyatt 1999). Těžiště doby kvetení je od března do června (Hlásná Čepková et al. 2016). Při generativním rozmnožování se utvoří nenápadná semena, která dozrávají koncem srpna a po dozrání se ihned uvolňují. Po uvolnění nejsou schopna hned klíčit, klíčí až po několika měsících, kdy byla uložena v chladném a vlhkém prostředí. První klíčící rostliny se objevují v pozdním jaru. Když dojde k opylení, semeníky barvínku se mění v úzce elipsoidní měchýřky a zároveň dojde ke sklonění květních stopek, na jejichž koncích se měchýřky nacházejí. Měchýřky ze sebe semena vypudí ještě v zeleném stavu puknutím. Mezi stanovišti může být dále rozšiřován ptáky nebo také myrmekochorně (Lhotská et al. 1985).

3.5 Genetická diverzita druhu *Vinca minor* a příbuzných druhů

Jak už bylo napsáno výše, b. menší je původní v oblasti Mediteránu. V této oblasti je schopný generativního množení, vytváření plodů. Generativní rozmnožování je pro genetickou diverzitu důležitým aspektem. Möller (2015) ve své disertační práci porovnávala genetickou diverzitu mezi populacemi barvínku menšího a zjistila, že vzorky sebrané v Itálii, tedy v oblasti původního areálu, až na dvě výjimky vykazují vysokou genotypovou diverzitu. Naproti tomu ve střední Evropě a Severní Americe je genetická diverzita nízká, u sebraných jedinců se prokázala klonalita. Ze získaných vzorků bylo zjištěno celkem 105 alel, přičemž 62 z nich bylo v italských populacích, 17 alel v střeoevropských populacích a 26 alel bylo sdíleno jak italskými, tak střeoevropskými populacemi b. menšího (Möller et

al. 2015). To potvrzuje teorii, že genetická diverzita je vyšší v oblasti jeho původního areálu, tedy v oblasti mediteránu, kde je schopný generativního množení.

Genetická diverzita b. menšího byla studována i v České republice. Původnost tohoto druhu v České republice není jistá, někteří autoři ji podporují (Slavík 2000), někteří ji popírají (Prange 1996). Pro teorii nepůvodnosti b. menšího v České republice mluví argument, že v našich podmínkách není schopný generativního množení, tedy vytvářet plody. Přesto jsou jeho porosty schopny díky vegetativnímu množení velkých nárostů. Nicméně tato skutečnost vede k otázce, jak je vlastně b. menší v České republice geneticky variabilní. Na tuto otázku hledali odpověď Hlásná Čepková et al. (2016). Ti porovnávali vzorky (nejen z Čech, ale i jiných států střední Evropy) b. menšího sebrané z tzv. původních starobylých a nedávno vzniklých lokalit. Vzorky byly sebrány převážně na opuštěných osadách, starých hřbitovech a troskách hradů. Z jedné lokality se odebíral jeden vzorek, kvůli předpokladu, že díky klonálnímu růstu a homogenitě populace by se více vzorků z jedné lokality geneticky shodovalo. Genetickou variabilitu pak studovali použitím primerů ISSR (Inter simple sequence repeat) a výsledky pak porovnávali i s variabilitou tvarů listu. Zjistili, že na nedávno vzniklých lokalitách je genetická variabilita b. menšího vyšší než na lokalitách původních starobylých, kde vzorky vykazovaly identickou DNA, vysokou míru klonality (Hlásná Čepková et al. 2016). Sebrané vzorky se tak daly roztřídit do 2 klastrů podle genetické variability, přičemž klastr 2 jsou vzorky z nedávno vzniklých lokalit a klastr 1 vzorky z původních lokalit, což názorně popisuje dendrogram (Obrázek 4).



Obrázek 4 Genetická variabilita vzorků *Vinca minor* původem z České republiky, Slovenska a Německa (Hlásná Čepková et al. 2016).

V této práci Hlásné Čepkové et al. (2016) byl potvrzen statisticky významný vztah mezi genetickou variabilitou a morfologií listů u vzorků zařazených do dvou klastrů dle variability na úrovni ISSR primerů. Celkově byla zjištěna velká variabilita i ve tvaru a i ve velikosti listů. Jedinci sebraní z původních lokalit (klastr 1) měli listy široké v rozmezí od 1,00-1,11 cm a průměrnou délku řapíku 0,33 cm. Jedinci sebraní z nedávno vzniklých lokalit (klastr 2) pak měli listy s průměrnou šířkou 1,38 cm a průměrnou délkou řapíku 0,28 cm. Při porovnání délky listů se naměřené hodnoty mezi klastry významně nelišily. Dá se tedy říct, že jedinci klastru 1 mají užší listy a delší řapík a navíc jsou listy řidčeji rozmístěny (Hlásná Čepková et al. 2016).

Podobné výsledky vykazují i příbuzné druhy b. menšího např. barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*). Stejně jako b. menší se barvínkovec růžový pěstoval pro okrasu a je také využíván v medicíně pro obsah léčivých alkaloidů. Původním areálem barvínkovce růžového je Madagaskar. Odtud byl v 18. století Portugalci rozšířen do Indie, kde se naturalizoval. Podobně se rozšířil třeba i na Srí Lanku nebo do Mozambiku. Z těchto poznatků lze vidět jistou paralelu k rozšíření b. menšího. Z výzkumu také došli Shokeen et al. (2007) k podobným závěrům, tedy že vzorky sebrané v Indii, jakožto v nepůvodním areálu, vykazují nízkou genetickou diverzitu.

Mimo to studovali genetické vztahy mezi dalšími příbuznými druhy a rody barvínkovce růžového. Příbuzné rody (b. menší, oleandr obecný (*Nerium oleander*), thevecie peruánská (*Thevetia peruviana*)) byly jasně odděleny do jiného klastru od rodu barvínkovce (*Catharanthus*). Barvínkovce růžový je i v rámci příbuzných druhů (barvínkovce vláskatý (*C. trichophyllus*), b. drobný (*C. pusillus*)) odlišný a tyto příbuzné druhy jsou řazeny do jiných klastrů. Zjištění genetické variability a příbuznosti Shokeen et al. (2007) provedli metodou mikrosatelitů (SSRs).

3.6 *Vinca minor* využití

Barvínek je spolu s pelyňkem pravým (*Artemisia absinthium*), dobromyslí obecnou (*Origanum vulgare*), pastinákem setým (*Pastinaca sativa*), mydlicí lékařskou (*Saponaria officinalis*) nebo violkou vonnou (*Viola odorata*) kulturní středověký relikv (Celka 2011). Porosty b. menšího se často soustřeďují kolem potoků, bývalých zemědělsky využívaných ploch a jiných ploch, na které byla ve středověku vázána přítomnost člověka. Díky tomuto poznatku může b. menší sloužit jako indikátor bývalých středověkých osad a archeofyt využívaný při nedestruktivních archeologických metodách (Hejcman et al. 2013, Stolz 2013). Nedestruktivní archeologie se věnuje zjištění minulosti dané lokality dále např. pomocí rozboru půdy a zjištění přítomnosti množství některých prvků (např. P, Ca, As, Pb) (Hejcman et al. 2013). Ve středověku byl b. menší kulturní rostlinou používanou jak v lidovém léčení, tak i pro okrasu či jako rituální předmět. Římané věřili, že je ochráně před zlem, před čarodějnictvím a byl součástí třeba i při duchovních obřadech. Při pohřbívání s ním zdobili hroby a pletli z něho věnce (Prange 1996). Římanům byly známy jeho léčivé účinky a ty se využívají i v dnešní medicíně.

B. menší obsahuje přes 50 druhů alkaloidů (Khanavi et al. 2010), z nichž se některé používají přes 40 let při léčbě rakoviny a zhoubných nádorů jako doprovodná léčba k chemoterapii (Vincent et al. 2015). K nejčastěji studovaným alkaloidům b. menšího patří vinkamin. Ten se používá třeba při léčbě onemocnění nervové soustavy, poruchách paměti nebo při zvýšeném krevním tlaku (Korbelář, Endris 1981, Hasa et al. 2013). Dalším alkaloidem b. menšího, který se v poslední době využívá je vinkaleukoblastin. Ten trvale snižuje počet bílých krvinek a potlačuje

nádorové bujení (Korbelář, Endris 1981). Alkaloidy barvínku se dále používají k léčbě gastritidy, zánětu střev, průjmových onemocnění, zvýšeného množství cukru v krvi nebo dokonce k odstavení kojení (Khanavi et al. 2010). Vinkamin je lidským tělem dobře tolerován, ale z doporučených dávek přípravku se orálním podáním do těla vstřebá pouhých 20%. Výsledky studie (Hasa et al. 2013) ukázaly, že by se toto procento mohlo navýšit jiným způsobem získávání vinkaminu z rostliny a to v podobě sušených extraktů. Ty mohou obsahovat až 40 % vinkaminu z celkové váhy sušiny. Ke zvýšení procenta vstřebaného vinkaminu do organismu přispívají látky obsažené v samotném barvínku (např. polygenoly a saponiny), které se ovšem při stávajících metodách při získávání vinkaminu separují (Hasa et al. 2013). Při zevním podání se využívá při bolesti v krku, krvácení z nosu, sraženinách nebo také pro léčbu ekzémů (Khanavi et al. 2010).

3.7 Zaniklá středověká vesnice Svídna

Zaniklá středověká vesnice Svídna se nachází v obci Drnek, která se nachází v Kladně. Přesné časové určení jejího vzniku není známo, ví se však, že vznikla buď v průběhu 13. století nebo na počátku 14. století. Byla založená jako zemědělská jednotka, což je celkem překvapivé, protože v této oblasti nejsou nejvhodnější zemědělské podmínky. Chyběl zde trvalejší povrchový zdroj vody. Její obyvatelé pravděpodobně čerpali vodu z vykopané studny, její archeologický nález je ale zatím neprokázaný, i když se o něm spekuluje. Dále jsou zde hnědé, silně jílovité neúrodné půdy, kterým na úrodnosti nepřidá ani jejich mělkost. Horninové podloží Svídny jsou turonské křídové usazeniny, slínovce, které byly použity na výstavbu budov. Dalším materiálem pro výstavbu byly použity cenomanské pískovce, které se nacházely v blízkosti Svídny. Jádrem vsi byla protáhlá obdélníková náves orientovaná od severo-východu na jiho-západ. Celková rozloha je odhadována na 14,1 ha (245 x 170 m). Převládaly zde dubové, listnaté porosty (dubo-habrové háje, subxerofilní doubravy, acidofilní doubravy). Podle Quitta (1971) leží Svídna na pomezí mírně teplé (QMT11) a teplé oblasti (QT2). To znamená delší teplá a suchá léta a krátké teplé mírné zimy, během kterých je sněhová pokrývka jen krátce. Průměrná roční teplota se pohybuje mezi 8-7°C, což se jeví jako zemědělsky příznivé, nicméně poněkud hůř jsou na tom srážky, kterých je 500-550 mm ročně. Klimatické podmínky tedy také nejsou pro zemědělství moc přívětivé. Koncem 15. století a

v první polovině 16. století se oteplilo klima a nastaly tak pravděpodobně ještě větší problémy s nedostatkem vody. To vše mohou být důvody, proč byla Svídna v první polovině 16. století vysídlena. Nebyly nalezeny žádné známky násilného konce Svídný ani stopy požáru, vše nasvědčuje zvolnému a vědomému opuštění. Tak po zhruba 200 letech existence byla opuštěna a zarostla lesem. Znovuobjevena byla roku 1996 díky povrchovému průzkumu (Smetánka 1988).

3.8 Mikrosatelity

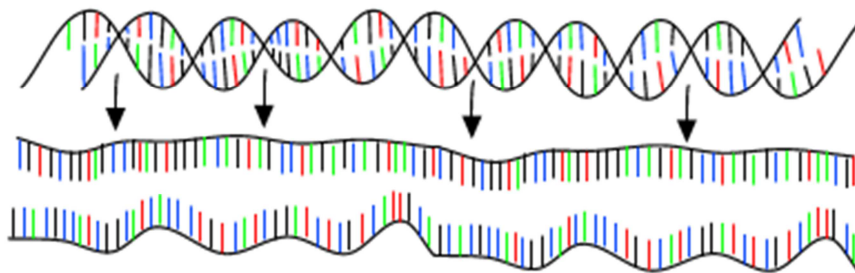
Mikrosatelity jsou běžné genetické markery využívané ke zkoumání genetické variability populací. Znalost genetické variability pak může být klíčem ke zjištění evolučních procesů a propojenosti populací, čehož se využívá k plánování ochranných strategií pro zachování biodiverzity (Balloux, Lugon-Moulin 2002). Mikrosatelity nebo také mikrosatelitní DNA též SSR (simple sequence repeats) jsou krátké tandemově se opakující úseky oligonukleotidů, ve kterých se mnohokrát opakují určité motivy sekvencí (např. A_n , $(AT)_n$, $(ATA)_n$, kde index n označuje počet opakování - repeticí). Počet opakování na lokusu definuje alelu, jejíž délku lze zjistit pomocí PCR amplifikace (kapitola 3.9). Mikrosatelity mohou vznikat beztemplátovou syntézou DNA za zvýšené teploty a přítomnosti různých koncentrací iontů. Jsou specifické dynamickými mutacemi, což znamená, že se přidávají či ubírají celé kopie základního motivu. U člověka může nadměrné prodloužení mikrosatelitů vést i k neurodegenerativním onemocněním. Mikrosatelity jsou velmi nestabilní, snadno a reverzibilně mění své uspořádání, čímž mění své vlastnosti. Důsledkem toho se pak při replikaci jeví polymeráze jiné než jsou, což způsobí, že polymeráza změní délku syntetizovaného řetězce. Jejich význam však není dosud objasněn (Kypr 1999, Vieira et al. 2016). Mikrosatelity jsou jedny z nejvhodnějších molekulárních markerů využívaných v genetice rostlin k zjišťování příbuznosti díky tomu, že se hojně vyskytují v celém genomu, jsou extrémně variabilní a lze pomocí nich rozlišit heterozygoty. V jaderné DNA se nacházejí dvě kopie každého mikrosatelitu (tzn. diploidní jedinec = 2 alely) (Metody analýzy mikrosatelitů 2017). Jejich nevýhoda vězí ale v obtížnosti jejich nalezení. Každá repetitivní sekvence, tedy mikrosatelit, má na svém konci a začátku „flanking regions“, což jsou přiléhající oblasti, které jsou stejné pro daný mikrosatelit a pro všechny jedince zkoumaného druhu. Toho se využívá při navrhování primerů (řetězec o několika

bazích, díky kterému může začít DNA polymeráza začít replikovat DNA). Sekvence primerů se zjišťuje sekvenováním (zjišťování pořadí nukleových bazí) genomu nebo se využívá znalosti primerů příbuzných druhů (cross-amplifikace) (Fornůstková 2007).

3.9 PCR

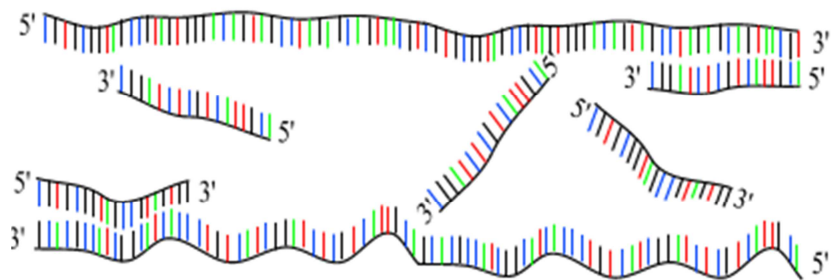
PCR je zkratka anglického názvu polymerase chain reaction, což je v překladu polymerázová řetězová reakce. PCR je molekulární metoda používaná k amplifikaci tedy množení fragmentu DNA *in vitro*. Tento proces je podobný replikaci DNA *in vivo*. Používá se k ní přístroj termocykler, který zajistí potřebné teplotní cykly (cca 30-40), během kterých probíhají tyto fáze (Kočárek 2007, Lysková 2008):

1. Denaturace (Obrázek 5) – probíhá 1 min při teplotě 94-95°C, což je teplota, během které dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi bázemi DNA, dvoušroubovice se tedy rozděluje na dvě vlákna. DNA je schopna při snížení teploty opět renaturovat (Kočárek 2007, Lysková 2008).



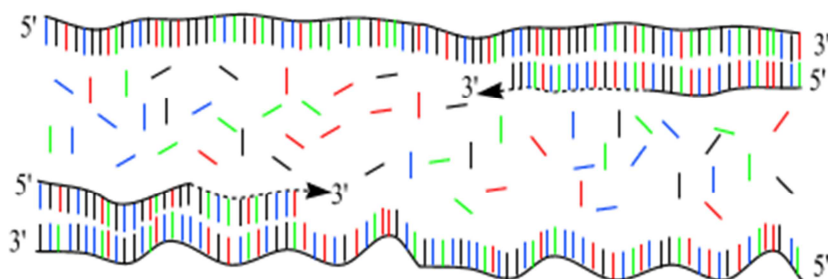
Obrázek 5 Denaturace (Vierstraete 1999).

2. Hybridizace (Obrázek 6) – někdy nazývaná anglickým pojmem „annealing“ probíhá 45 s při teplotě 40-65°C, ochlazením dochází k renaturaci. Primery (chemicky syntetizované krátké oligonukleotidy) přítomné ve vzorku hybridizují rychleji než jednořetězcové molekuly DNA, a tak se naváží na svou komplementární sekvenci dříve (Kočárek 2007, Lysková 2008).



Obrázek 6 Hybridizace (Vierstraete 1999).

3. Extenze (Obrázek 7) – probíhá 2 min při teplotě 72°C. Během ní dochází k syntéze nukleotidových řetězců. Syntéza je katalyzována DNA polymerázou, která prodlužuje vlákna DNA od primerů ve směru od 5' konce k 3' konci. K syntéze nových vláken je třeba v PCR reakci nadbytečné množství deoxynukleotidtrifosfátů (Kočárek 2007).



Obrázek 7 Extenze (Vierstraete 1999).

4 Metodika

4.1 Charakteristika místa sběru vzorků

Vzorky byly sebrány ze zaniklé středověké vesnice Svídna (Příloha 1). V současné době je zalesněna a člověk na ni nemá přímý vliv kromě lesnického hospodaření, ovšem relikty zdí budov a zídek oddělující parcely jsou velmi dobře rozpoznatelné. Specifikace Svídny jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1).

Studované území	Svídna
Lokalizace	35 km SV od Prahy, poblíž starobylé vesnice Drnek
Souřadnice	N 50°12'101'' E 13°57'156''
Nadmořská výška	426 m n. m.
Průměrná roční teplota	7°C
Průměrné roční srážky	500-550 mm
Matečná hornina	Písečné slínovce a spongilitické jílovce
Půdní typ	Pararendzina
Potenciální přirozená vegetace	<i>Tiliocordatae-Fagetum</i>
Druhovú skladba	Smíšený les- <i>Larix decidua</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Fagus sylvatica</i> Menší nemíšené porosty- <i>Picea abies</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Fagus sylvatica</i> Keřové patro-jen místy (<i>Corylus avellana</i> , <i>Cornus Sanguinea</i>)

Tabulka 1 Charakteristiky studovaného území Svídna

4.2 Sběr a příprava materiálu

Zaniklá středověká vesnice Svídna se skládá ze 14 pozemků, přičemž pozemek označený číslem 14 se dělí na 3 menší pozemky (14a, b, c). Pro vyhodnocení morfologických parametrů byly odebrány z každého pozemku kromě parcel 12 a 13 vzorky z označených ploch na Obrázku 8 a to v podobě veškeré biomasy na ploše 40x40 cm. Tyto vzorky byly přeneseny v plastových pytlích do laboratoře, kde byla rozplavením odstraněna půda a mechanicky odděleny ostatní druhy rostlin. Následovala separace nadzemní biomasy od podzemní biomasy,

oddělování listů a stonků nadzemní biomasy a kořínků a oddenků podzemní biomasy. Pro účely genetické analýzy byla z každé označené plochy odebrána jedna celá rostlina b. menšího, která byla umístěna na experimentálním pozemku Botanické zahrady Fakulty tropického zemědělství (BZ FTZ, ČZU) a pěstována v konstantních podmínkách.



Obrázek 8 Mapa zaniklé středověké vesnice Svídný. Oranžovými číslicemi jsou označeny jednotlivé parcely a kolečky místa sběru (Smetánka 1988, upr.)

4.3 Morfometrie

Ze separovaných vzorků byly naměřeny šířka listů, délka listů, počet nodů (včetně terminálního) a délka stonků s přesností na 0,5 mm pravítkem. Od každého vzorku se měřilo 5 listů a 5 stonků z jedné rostliny. Parametry naměřené na listech byly kromě samotných délek a šířek vyhodnoceny i jako podíl (délka:šířka), čímž se získala informace o tvaru listu. Morfometrické údaje pak byly statisticky vyhodnoceny v programu Statistica 12.0 software. Byla použita metoda ANOVA (Analysis of variance) pro rozdělení vzorků do vzájemně porovnávaných skupin a pro zjištění statisticky významné difference byl použit post hoc Tukey test na hladině $p \leq 0.05$.

4.4 Genetika

4.4.1 Extrakce DNA

Extrakce DNA byla prováděna podle protokolu Doyle, J. J., Doyle J. L. (1987) na homogenizovaných rostlinných pletivech čerstvých listů o hmotnosti cca 100 mg (Obrázek 9). Listy se očistily etanolem a jemně natrhané kousky se vkládaly do zkumavek (Obrázek 10), do kterých bylo přidáno pět skleněných kuliček. Zkumavky se vložily do mlýnku Retsch MM 400 (Retsch, Německo) na 5 min a 30 ot/s (Obrázek 11). V digestoři se pak do nadrceného materiálu přidal roztok CTAB s 2% merkaptoetanolu (celkem 700 μ l směsi na jeden vzorek) a navíc oproti protokolu špetka PVP (Carl Roth, Německo) a 5 μ l Rnasy A (10mg/ml) (Thermo Scientific, USA). Zkumavky se promíchaly na vortexu a poté se inkubovaly 30 min na termomixéru při 60°C a 1400 ot/min. Dále se inkubované vzorky centrifugovaly 6 min při otáčkách 13200 ot/min. Supernatant se přepipetoval opět v digestoři do nových zkumavek (na každý vzorek čistá špička) a přidalo se 500 μ l směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1). Po uzavření zkumavek se 2-3x převrátily a nechaly se cca 5 min stát. Následně se centrifugovaly 6 min při 13200 ot/min. Vznikl dvoufázový roztok (Obrázek 12), ze kterého se opatrně odebral do nových zkumavek (1,5 ml) vrchní supernatant tak, aby se do něj nepřimíchaly nečistoty (opět na každý vzorek čistou špičku). Do nových zkumavek bylo přidáno 500 μ l vychlazeného isopropanolu, 1-2 se převrátily (Obrázek 13) a nechaly 30 min stát v -20°C. Poté se stočily na centrifuze 3 min při 13200 ot/min, čímž se oddělila DNA s trochou nečistot (Obrázek 14) a supernatant se opatrně slil do kádinky v digestoři. Otevřené zkumavky se poté převrátily dnem vzhůru na filtrační papír a následně se přidalo 400 μ l vychlazeného 96% etanolu. Zkumavky se uzavřely, vložily do termomixéru nastaveného na 37°C na 3 min a 1200 ot/min a poté stočily na centrifuze 5 min při 13200 ot/min. Supernatant se opatrně slil do kádinky a do zkumavek se přidalo 200 μ l vychlazeného 70% etanolu. Následně se 3 min při 13200 ot/min stočily na centrifuze. Obsah se opět vylil do kádinky a zkumavky otočily dnem vzhůru a položily na filtrační papír. Neuzavřené zkumavky se vysušily na termobloku při 65°C 6-10 min. K vysušenému peletu bylo přidáno 50 μ l ddH₂O a uzavřené zkumavky se inkubovaly 10 min na termobloku při 60°C a 600 ot/min. Vzorky se nakonec promíchaly na vortexu a krátce stočily na centrifuze. Integrita a kvalita extrahované DNA se zjistila na 1% agarózovém gelu (Příloha 3). Pro následující krok (PCR) jsou

vhodné vzorky o koncentracích 20 μ l, koncentrace proto byla kontrolována na přístroji Nano Drop 2000c device (Nano Drop products, USA) a jelikož většina vzorků měla koncentraci mnohonásobně vyšší, byly vzorky naředěny ddH₂O na potřebnou koncentraci. Vzorky byly poté uloženy v -20°C.



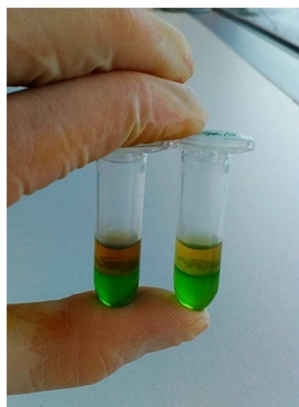
Obrázek 9 Vážení čerstvých listů na hmotnost 0,1 g



Obrázek 10 Manuální přípravné natrhání listů



Obrázek 11 Drcení vzorků



Obrázek 12 Dvofázový roztok získaný během extrakce DNA



Obrázek 13 Čištění DNA isopropanolem



Obrázek 14 Usazená DNA s trochou nečistot

4.4.2 Mikrosatelity

Pro b. menší je známo 18 mikrosatelitových sekvencí (Möller et al. 2015). Pro naše potřeby bylo vybráno 12 mikrosatelitových párů (Sigma-Aldrich, ČR) (Příloha 2). Aby se ověřila jejich funkčnost pro druh b. menší, byly použity v optimalizační části neznačené mikrosatelitové sekvence. Označené mikrosatelitové sekvence byly pak sestaveny do tří funkčních multiplexů (Tabulka 3) podle teploty hybridizace („annealing“) a délky fragmentů, což umožňovalo amplifikaci více lokusů během jedné PCR.

4.4.3 PCR

Pro PCR se připravily vzorky o celkovém objemu 10 μl složené z 5 μl QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Německo), 3,5 μl ddH₂O, 1 μl genomické DNA (20 ng/ μl), primerů (oba o objemu 0,2 μl a koncentraci 10 μM) - forward (s 5'-M13 ocásekem) a reverse primer a fluorescenční barva (0,1 μl) (PET, VIC, NED a FAM). Promíchané vzorky se vložily do termocykleru s následujícím nastavením (Tabulka 2):

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování kroku
1. Denaturace	95°C	15 min	1
2. Annealing I	94°C	30 s	30
	55°C	45 s	
	72°C	1 min	
3. Annealing II	94°C	30 s	8
	52°C	45 s	
	72°C	1 min	
4. Konečná elongace	72°C	10 min	1
5. Zchlazení	4°C		

Tabulka 2 Jednotlivé kroky PCR použité pro amplifikaci DNA u vzorků *V.minor*

Úspěšnost amplifikace pak byla testována na 1% agarozovém gelu v TBE pufru.

4.4.4 Příprava vzorků na fragmentační analýzu

Připravila se směs formamidu (12 μl na 1 vzorek) a Lizu (0,2 μl na 1 vzorek). K této směsi se přidal 1 μl spipetovaného PCR produktu (složeného ze všech 4 barev - FAM, VIC, PET, NET, (Applied Biosystem, UK)) (Tabulka 3). Raw data pak byla vyhodnocena pomocí programu GeneMarker GeneMarker ver. 1.8 (SoftGenetics, State park, PA, USA) (Příloha 4).

5 Výsledky práce

5.1 Genetické analýzy

V optimalizační části bylo vybráno 12 mikrosatelitových sekvencí pro následnou analýzu u 14 vzorků b. menšího z lokality Svídna. V prvním kroku byly použity neznačené mikrosatelitové sekvence a byla potvrzena jejich funkčnost pro druh b. menší. V této části se také vyzkoušelo, zda je funkční koncentrace DNA (20 ng/μl) a množství jednotlivých reagensů vkládaných do PCR. Výsledné PCR produkty byly naneseny na gel, po této vizuální kontrole, zda probíhá správně amplifikace DNA pro jednotlivé mikrosatelitové úseky (Příloha 3), byly značené mikrosatelitové sekvence sestaveny do tří multiplexů tak, aby se nekryly barvami (PCR multiplex 1: Vm05, Vm07, Vm11, Vm15; PCR multiplex 2: Vm26, Vm34, Vimi25, Vimi26; PCR multiplex3: Vimi34, Vimi39, Vimi43, Vimi53). Velikost fragmentů se pohybovala od 154 do 262 bp. Jak je patrné z Tabulky 3 na jednom lokusu byla vždy pouze jedna alela („A“), jejíž délku jsme zjistili PCR amplifikací („Velikost fragmentu (bp)“).

No.	Lokus*	T(°C)	Velikost fragmentu (bp)	A	He	Ho	Barva	PCR multiplex
1	Vm05	55	218-233	1	0	0	PET	1
2	Vm07	55	186-201	1	0	0	NED	1
3	Vm11	55	147-156	1	0	0	FAM	1
4	Vm15	55	260-262	1	0	0	VIC	1
5	Vm26	55	158-164	1	0	0	PET	2
6	Vm34	55	178-186	1	0	0	NED	2
7	Vimi25	55	134-149	1	0	0	FAM	2
8	Vimi26	55	154-149	1	0	0	VIC	2
9	Vimi34	55	164-174	1	0	0	PET	3
10	Vimi39	55	158-160	1	0	0	NED	3
11	Vimi43	55	223-226	1	0	0	FAM	3
12	Vimi53	55	184-206	1	0	0	VIC	3

Tabulka 3 Výsledky genetických analýz pomocí markerů SSR

Díky SSR se potvrdila naše očekávání, že je heterozygotita nulová. Genetickými analýzami reprezentativních jedinců z lokality Svídna se prokázalo, že na úrovni těchto mikrosatelitových primerů je zdejší populace b. menšího složena z geneticky uniformních jedinců a že je tedy genetická variabilita velmi nízká. Lze

přepokládat, že tato populace vznikla předáváním rostlin v rámci sousedství, že pocházely z jedné zdrojové rostliny.

5.2 Morfometrické analýzy

Průměrná šířka listu b. menšího na lokalitě Svídna je $15,69 \pm 2,67$ mm. Šířka listů jedinců b. menšího je na této lokalitě hodně variabilní, mezi nejmenším a největším změřeným listem byl rozdíl přes 8 mm. Průměrná délka listu je $33,31 \pm 5,39$ mm. Stejně jako šířka listu je jeho délka taktéž velmi variabilní. Nejmenší naměřená hodnota délky listu byla $25,20 \pm 2,49$ mm a největší $43,00 \pm 4,06$ mm. Podílem délky a šířky listu jsme dostali informaci o tvaru. I přes variabilní délku a šířku listů jsme jejich podílem dostali vcelku jednotnou hodnotu, v průměru $2,16 \pm 0,38$ mm, čímž se b. menší na Svídne řadí k typickým populacím b. menšího starobylých lokalit, tedy k populacím s širším charakterem tvaru listů. V průměru se pak dále na jednom stonku vyskytuje 5 ± 2 nodů (včetně terminálního) a délka samotného stonku je $189,47 \pm 103,92$ mm. U délky stonku data hodně kolísala kolem průměru.

Počet vzorků	Vzorek	Počet opakování	Šířka listu (mm)	Délka listu (mm)	Poměr délka/šířka listu	Počet nodů	Délka stonku (mm)
1	S1	5	$15,2 \pm 1,30^{abc}$	$35,00 \pm 2,35^b$	$2,31 \pm 0,18^{bc}$	$4,20 \pm 1,30^a$	$166,20 \pm 24,99^{abc}$
2	S2	5	$12,20 \pm 0,84^a$	$32,40 \pm 2,07^b$	$2,66 \pm 0,22^c$	$4,00 \pm 1,00^a$	$120,40 \pm 19,49^{ab}$
3	S3	5	$12,4 \pm 0,55^{ab}$	$33,40 \pm 1,82^b$	$2,69 \pm 0,13^c$	$5,40 \pm 1,14^a$	$174,80 \pm 29,56^{abc}$
4	S4	5	$15,60 \pm 2,79^{abc}$	$33,40 \pm 3,65^b$	$2,17 \pm 0,21^b$	$4,00 \pm 0,71^a$	$155,00 \pm 26,12^{abc}$
5	S5	5	$16,40 \pm 1,14^{bcd}$	$33,00 \pm 0,71^b$	$2,02 \pm 0,10^b$	$4,00 \pm 0,71^a$	$157,80 \pm 21,66^{abc}$
6	S6	5	$14,40 \pm 1,52^{abc}$	$32,60 \pm 1,67^b$	$2,28 \pm 0,27^{bc}$	$5,60 \pm 1,34^a$	$171,60 \pm 46,56^{abc}$
7	S7	5	$16,20 \pm 1,64^{abc}$	$35,20 \pm 3,90^b$	$2,18 \pm 0,28^b$	$4,20 \pm 0,45^a$	$181,40 \pm 18,42^{bc}$
8	S8	5	$16,20 \pm 1,10^{abc}$	$36,80 \pm 3,42^{bc}$	$2,27 \pm 0,16^{bc}$	$5,00 \pm 1,58^a$	$179,20 \pm 43,22^{bc}$
9	S9	5	$15,60 \pm 3,05^{abc}$	$32,80 \pm 4,49^b$	$2,13 \pm 0,27^b$	$5,80 \pm 1,10^a$	$224,60 \pm 23,05^c$
10	S10	5	$15,20 \pm 1,79^{abc}$	$33,40 \pm 3,29^b$	$2,21 \pm 0,25^b$	$3,80 \pm 0,84^a$	$149,40 \pm 16,74^{abc}$
11	S11	5	$14,60 \pm 1,52^{abc}$	$22,80 \pm 1,30^a$	$1,57 \pm 0,16^a$	$4,20 \pm 1,64^a$	$73,40 \pm 30,88^a$
12	S14a	5	$17,60 \pm 2,07^{cd}$	$37,40 \pm 2,07^c$	$2,14 \pm 0,19^b$	$9,00 \pm 2,12^b$	$347,00 \pm 85,34^d$
13	S14b	5	$17,60 \pm 1,52^{cd}$	$25,20 \pm 2,49^a$	$1,44 \pm 0,15^a$	$5,80 \pm 1,64^a$	$101,80 \pm 36,14^{ab}$
14	S14c	5	$20,40 \pm 3,51^c$	$43,00 \pm 4,06^c$	$2,13 \pm 0,18^b$	$11,20 \pm 0,84^b$	$450,00 \pm 111,41^d$
	Průměr	70	$15,69 \pm 2,67$	$33,31 \pm 5,39$	$2,16 \pm 0,38$	$5,44 \pm 2,37$	$189,47 \pm 103,92$

Tabulka 4 Výsledky statistické analýzy morfometrických dat

Tabulka 4 uvádí sumarizaci výsledků morfometrických parametrů (průměr \pm směrodatná odchylka) vyhodnocených pomocí ANOVA (Statistica 12.0) u dat naměřených na 14 vzorcích lokality Svídna. Statisticky průkazné rozdíly ($p \leq 0,05$)

dle Tukey post hoc testu jsou označeny různými písmeny (indexy) u hodnot ve sloupečcích.

6 Diskuze

V současné době je b. menší považován za autochtonní druh (Slavík 2000). Autochtonní druhy mají ale obvykle větší genetickou variabilitu ve svém přirozeném areálu a jsou schopné generativního množení (Müller, Sukop 2016). Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že populace b. menšího na lokalitě Svídna vykazuje nulovou genetickou variabilitu a je tvořena pouhým jedním klonem, vznikla tedy vegetativním množením stejně jako většina populací b. menšího na území ČR. Jelikož jde o jeden klon, lze předpokládat, že populace vznikla z jedné zdrojové rostliny. Nejen v ČR ale i v Německu a na Slovensku vykazují populace b. menšího nižší genetickou diverzitu na starobylých lokalitách oproti populacím na nedávno vzniklých lokalitách (Hlásná Čepková et al. 2016). Takové zjištění napovídá tomu, že byl b. menší ve středověku šířen pouze z malých zdrojových populací a mohl být předáván mezi obyvateli jako okrasná či léčivá rostlina. Nepůvodnost b. menšího ve střední Evropě naznačují i další autoři (Prange 1996, Müller, Sukopp 2016). Nízká diverzita populací b. menšího byla prokázána i v Severní Americe (Möller 2015). B. menší je tedy dle zmíněných studií málo geneticky diverzifikovaný a neschopný generativního množení ve všech svých nepůvodních areálech. To není neobvyklé ani pro příbuzné druhy b. menšího. Shokeen et al. (2007) došli k podobným výsledkům při studiu druhu barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*) s použitím stejných genetických markerů, mikrosatelitů. Ten mimo svůj původní areál vykazuje také nízkou někdy až nulovou genetickou variabilitu a množí se hlavně vegetativně.

Jelikož se z genetických analýz ukázalo, že je genetická variabilita populace b. menšího na Svídne nulová, veškerá morfologická variabilita populace na Svídne je tedy ovlivněna pouze podmínkami prostředí, popř. stářím měřených částí rostliny, což jsme se snažili eliminovat výběrem pouze plně vyvinutých částí rostlin. Morfometrická data naměřená na jedincích b. menšího ze zaniklé středověké Svídny byla poměrně variabilní. V porovnání s jedinci sebraných na nedávno vzniklých lokalitách (Hlásná Čepková et al. 2016) vykazovaly širší charakter listu stejně jako jedinci b. menšího sebraní ze starobylých lokalit (Hlásná Čepková et al. 2016).

7 Závěr

B. menší je původním druhem oblasti mediteránu, kde také dosahuje své nejvyšší genetické diverzity. V jiných oblastech jako je Severní Amerika nebo střední Evropa je jeho genetická diverzita nižší a často se jedná o klonální rostliny. V ČR se názory o jeho původnosti liší. V našich podmínkách není schopen generativního množení a výsledky posledních výzkumů se přiklání spíše k jeho nepůvodnosti. Jeho původnost lze jednoznačně určit genetickými analýzami. V této bakalářské práci byly provedeny genetické analýzy pomocí metody mikrosatelitů (SSR) na vzorcích b. menšího ze zaniklé středověké vesnice Svídna. Metoda mikrosatelitů se ukázala jako vhodná pro zkoumání genetické variability tohoto druhu. Zdejší populace vykazuje velmi nízkou genetickou variabilitu a jedná se s nejvyšší pravděpodobností o jeden klon. Potvrzuje se tak předpoklad, že sem byl tento druh zavlečen a předáván v rámci lidového léčitelství či pro okrasu z pouhých několika zdrojových populací. B. menší byl zavlečen do střední Evropy pravděpodobně Římany ve středověku, což potvrzují i první záznamy. Populace b. menšího na zaniklé středověké vesnici Svídna se na základě výsledků bakalářské práce řadí do skupiny barvínků starobylých lokalit. Populace b. menšího na starobylých lokalitách vykazují kromě nízké genetické variability také širší charakter listů oproti populacím nedávno vzniklých lokalit, což potvrzují i výsledky této bakalářské práce. Jelikož jsou na Svídně geneticky uniformní jedinci, tak veškerá morfologická variabilita mezi jedinci na dané lokalitě je dána podmínkami prostředí.

8 Literatura

- Balloux F., Lugon-Moulin N., 2002: The estimate of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155–165.
- Celka Z., 2011: Relics of cultivation in the vascular flora of medieval West Slavic settlements and castles. *Biodiversity Research Conservatin* 22: 1–110.
- Danihelka J., Chrtěk J., Kaplan Z., 2012: Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* 84: 647–811.
- Dostál J., 1989: *Nová Květena ČSSR 2. díl*. Academia, Praha.
- Doyle, J. J., Doyle J. L., 1987: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Ellenberg H., 1986: *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*. Ulmer, Stuttgart.
- Fleming T., 2004: *PDR for Herbal Medicines*. Medial Economics Company, Montvale.
- Fornůstková A., 2007: Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopýrů. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Brno. 23 s. (bakalářská práce). „nepublikováno“.
- Hasa D., Perissuti B., Dall'Acqua S., Chierotti M. R., Gobetto R., Grabnar I., Cepek C., Voinovich D., 2013: Rationale of using *Vinca minor* Linne dry extract phytocomplex as a vincamine's oral bioavailability enhancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84: 138–144.
- Hejcman M., Karlík P., Ondráček J., Klír T., 2013: Short-Term Medieval Settlement Activities Irreversibly Changed Forest Soils and Vegetation in Central Europe. *Ecosystems* 16: 652–663.
- Hlásná Čepková P., Karlík P., Viehmannová I., Müllerová V., Šmejda L., Hejcman M., 2016: Genetic and Leaf-trait variability of *Vinca minor* at ancient and recent localities in Central Europe. *Biochemical Systematics and Ecology* 64: 22–30.
- Khanavi M., Pourmoslemi S., Farahanikia B., Hadjiakhoondi A., Ostad S. O., 2010: Cytotoxicity of *Vinca minor*. *Pharmaceutical Biology* 48: 96–100.
- Kočárek E., 2007: *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů, Brno.
- Korbelář J., Endris Z., 1981: *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha.
- Kypr J., 1999: Prodlužování DNA a mikrosatelity. *Vesmír* 78: 328–329.
- Lhotská M., Kropáč Z., Maget J., 1985: *Kapesní atlas semen, plodů a klíčnicích rostlin*. SPN, Praha.
- Lipow S.R., Wyatt R., 1999: Floral morphology and late-actingself-incompatibility in *Apocynum cannabinum* (*Apocynaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 219: 99–109.

- Lipský Z., 1999: Krajinná ekologie pro studenty geografických oborů. Karolinum, Praha.
- Löw J., Míchal I., 2003: Krajinný ráz. Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.
- Lysková L., 2008: Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta, Brno. 45 s. (bakalářská práce). „nepublikováno“.
- Metody analýzy mikrosatelitů 2017: Analýza mikrosatelitů, katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta jihočeské univerzity (online) [cit.2017.03.12], dostupné z <<http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/mikrosatelitey.html>>.
- Meusel H., Jäger E., Weinert E., Rauschert S., 1978a: Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora Band, II Text. Volkseigene Betriebe Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Meusel H., Jäger E., Weinert E., Rauschert S., 1978b: Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora Band, II Karten. Volkseigene Betriebe Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Möller S., Wöhrmann T., Huettel B., Weising K., 2015: Development of 18 polymorphic microsatellite markers for *Vinca minor* (*Apocynaceae*) via 454 pyrosequencing. *Applications in plant science* 3 (5): (1500015).
- Möller S., 2015: Populationsgenetik und Phylogeographie des Archäophyten und Kulturreliktzeigers *Vinca minor* L. (*Apocynaceae*). Universität Kassel, Kassel. 216 s. (disertační práce). „nepublikováno“.
- Müller N., Sukopp H. 2016: Influence of different landscape design styles on plant invasion in Central Europe. *Landscape and Ecological Engineering* 12 (1): 151–169.
- Novák J., Skalický M., 2009: Botanika II. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Prange W., 1996: Das Kleine Immergrün (*Vinca minor* L.) in Westsdeutschland – eine Kulturreliktpflanze aus römischer Zeit. *Naturwissenschaftlichen Vereins Schleswig-Holstein* 66: 71–96.
- QuittE., (1971): Klimatické oblasti Československa. GÚ ČSAV, Brno.
- Shokeen B., Sethy N. K., Kumar S., Bhatia S., 2007: Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molekular variation in the medicinal plant Madagascar periwinkle. *Plant Science* 172: 441–451.
- Slavík B., 2000: Květena ČR 6. Academia, Praha.
- Smetánka Z. (1988): Život středověké vesnice: zaniklá Svídna. Academia, Praha.
- Stolz C., 2013: Archäologische Zeigerpflanzen: Fallbeispiele aus dem Taunus und dem nördlichen Schleswig-Holstein. *Schriften des Arbeitskreises Landes- und Volkskunde* 12: 54–80.

- Vieira M. L. C., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. F. 2016: Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39(3): 312–328.
- Vierstraete A., 1999: Principle of the PCR (online) [cit.2017.3.18], dostupné z <<https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.
- Vincent L. A., Attaoua C., Bellis M., Rozkydalova L., Kaddour K. H., Vian L., Cuq P., 2015: Lysosomes and unfolded protein response, determinants of melanoma cells to *vinca* alkaloids. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 29: 164–177.

9 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1 Barvíněk menší (<i>Vinca minor</i>)	10
Obrázek 2 Rozšíření <i>Vinca minor</i> na území ČR (Slavík 2000).	11
Obrázek 3 Rozšíření <i>Vinca minor</i> na území Evropy (Meusel et al. 1978b).	12
Obrázek 4 Genetická variabilita vzorků <i>Vinca minor</i> původem z České republiky, Slovenska a Německa (Hlásná Čepková et al. 2016).....	15
Obrázek 5 Denaturace (Vierstraete 1999).....	19
Obrázek 6 Hybridizace (Vierstraete 1999)	20
Obrázek 7 Extenze (Vierstraete 1999)	20
Obrázek 8 Mapa zaniklé středověké vesnice Svídny. Oranžovými číslicemi jsou označeny jednotlivé parcely a kolečky místa sběru (Smetánka 1988, upr.)	22
Obrázek 9 Vážení čerstvých listů na hmotnost 0,1 g.....	24
Obrázek 10 Manuální přípravné natrhaní listů.....	24
Obrázek 11 Drcení vzorků.....	24
Obrázek 12 Dvoufázový roztok získaný během extrakce DNA.....	24
Obrázek 13 Čištění DNA isopropanolem.....	24
Obrázek 14 Usazená DNA s trochou nečistot.....	24
Tabulka 1 Charakteristiky studovaného území Svídna.....	21
Tabulka 2 Jednotlivé kroky PCR použité pro amplifikaci DNA u vzorků <i>V.minor</i> ..	25
Tabulka 3 Výsledky genetických analýz pomocí markerů SSR	26
Tabulka 4 Výsledky statistické analýzy morfometrických dat	27

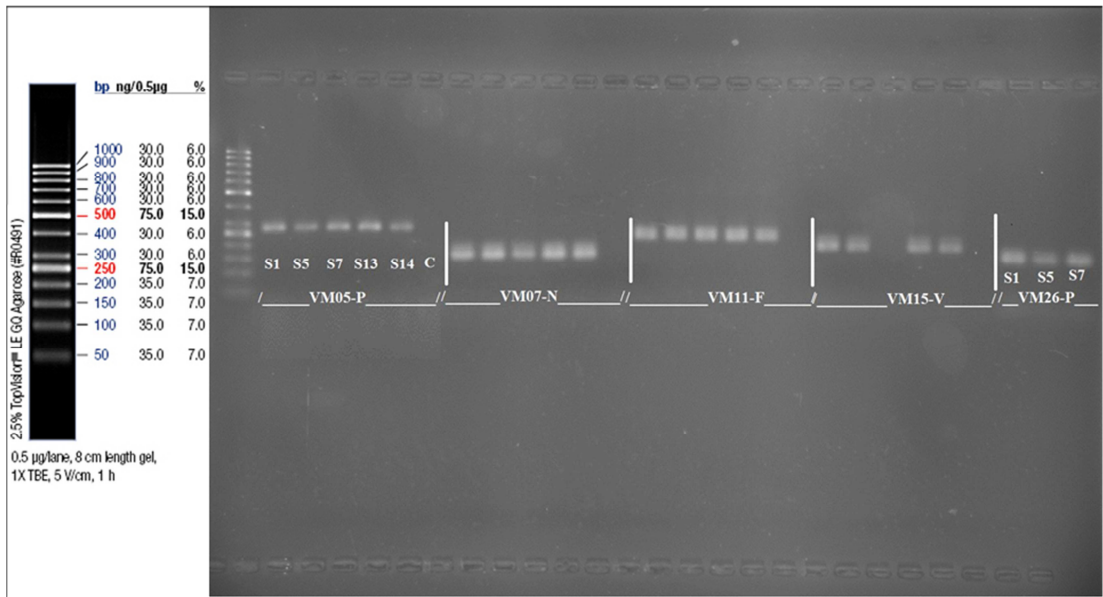
10 Přílohy



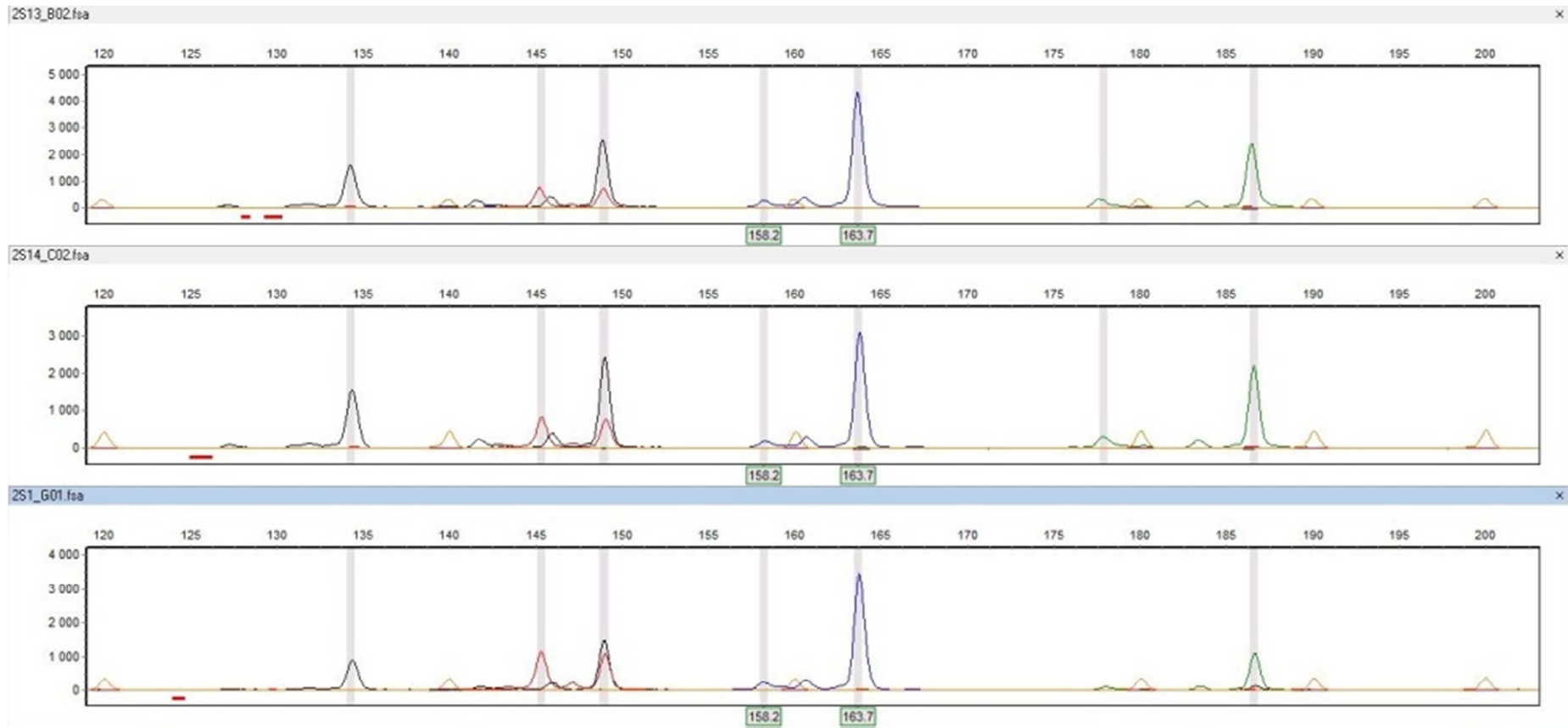
Příloha 1 Současný pohled na lokalitu bývalá středověká vesnice Svídna (autor: Michal Hejzman)

Identifikace	Lokus	Primerová sekvence	Opakující se
1	Vm05	F: TTTTGCCGACTTCTTATGTT R: CTTTATGTTCTTGCTTCCA	(CA) ₁₄
2	Vm07	F: GCATAATTGGTGCAGTTTAG R: GGGCAATAAAAATTCTCCTC	(TTA) ₁₆
3	Vm11	F: CTCAAGGCTAAATTGATAGC R: TGACATCTCTGTTCAAGTACAC	(ATA) ₁₄
4	Vm15	F: CATGTCCTTTATTCTAGCTG R: TCTCAAGTGTGCTACTCATAG	(AAT) ₁₂
5	Vm26	F: ACGGCTATGCTACAGACAATA R:	(GA) ₁₁
6	Vm34	F: GCGCTCGATCAACATATTA R: TCCTAGTCCAAGAACTCACAA	(TCTT) ₅
7	Vimi25	F: CCGTTTTCTATTCATTTTCT R: CCTGAACCTGGAATTAGAACT	(TGT) ₁₄
8	Vimi26	F: GTGGTTGTTGTAACAGAGGAA R: GGAAACTCAAATCCTTCTGA	(TTA) ₁₄
9	Vimi34	F: TCTCATTTACTCCCAACCTTC R: TTTGTGTCTGTAGCTTCTCG	(TAT) ₁₄
10	Vimi39	F: CTAGTGAAGCAAGATCAGCTC R: TCCATCCCTTTTACAGTTTC	(ACC) ₁₀
11	Vimi43	F: GCTGCTTAGACTTCTGATTC R: GAGTCCCTGTTTCTGTTGAT	(ATT) ₁₃
12	Vimi53	F: ACACCTGAGAATAGAGGTTCC R: CCAAACCATTTCCATCTAAG	(TC) ₁₉

Příloha 2 Přehled použitých primerů



Příloha 3 Ilustrativní obrázek kontroly integrity a kvality DNA elektroforézou na 1% agarozovém gelu



Příloha 4 Vyhodnocování raw dat pomocí programu GeneMarker ver. 1.8 (SoftGenetics, State park, PA, USA).