

PROBLEMATIKA URČOVÁNÍ DRUHŮ BŘÍZ *BETULA* L. VE SVĚTLE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Petr Karlík, Jana Ešnerová, Tomáš Urfus, Ivan Kuneš, Martin Baláš, Jan Vítámvás, Tereza Koňasová, Magdalena Kubešová, Tomáš Fér, Petr Vít

Klíčová slova: průtoková cytometrie, taxonomie, bříza, *Betula pendula*, *Betula carpatica*, *Betula pubescens*, *Betula nana*, *Betula petraea*

Abstract

The use of flow cytometry in research on genus *Betula* L.

Over the last decade there has been a huge increase in the use of flow cytometry (FCM) in studies on the biosystematics, ecology and population biology of vascular plant. In the present study, this method was used for research on genus *Betula* L. in the area of the Czech Republic. FCM was used for assessing the variation in ploidy levels and genome size.

Key words: flow cytometry, taxonomy, birch, *Betula pendula*, *Betula carpatica*, *Betula pubescens*, *Betula nana*, *Betula petraea*

Úvod

Břízy patří mezi obtížně určitelné taxony s velkou variabilitou určovacích morfologických znaků. Pro správnou determinaci a vhodné pojetí jednotlivých taxonů je proto nezbytné studovat fylogenetický vývoj tohoto rodu, což provedli Chen et al. (1999) a Järvinen et al. (2004). V jemnějším měřítku středoevropských taxonů však takováto studie dosud nebyla provedena. V současnosti se problematika bříz začala studovat na Fakultě lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze ve spolupráci s dalšími pracovišti (zejména Fakulta životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze a Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze). Celý projekt je zaměřen na mezioborové studium taxonomie, ekologie a problematiky pěstování horského reliktního druhu bříza karpatská *Betula carpatica* a příbuzných taxonů, zejména *B. pubescens* s. str. a *B. petraea*. Článek uveřejněný v tomto sborníku přináší vyhodnocení prvních výsledků genetických analýz, konkrétně průtokové cytometrie.

Co je cytometrie?

Průtoková cytometrie (anglicky flow cytometry, FCM) je metoda, jejíž pomocí byl v této studii zjišťován obsah jaderné DNA u sledovaných jedinců a byl určován stupeň ploidie. Při cytometrických analýzách se před vlastním měřením naváže na dvoušroubovici DNA sledovaného jedince fluorescenční barvivo a po jeho ozáření světlem vhodné vlnové délky je možné měřit intenzitu fluorescence v průtokovém cytometru. Pro správné stanovení ploidie studovaného druhu a odhad absolutního množství DNA je nezbytné používat tzv. interní standardy (= materiál se známým počtem chromozómů a určenou velikostí genomu). Na základě poměru intenzity fluorescence zkoumaného materiálu a standardu tak můžeme usuzovat na vlastnosti neznámého objektu (Suda 2005, Suda & Pyšek 2010).

Využití cytometrie pro determinaci bříz

Pomocí cytometrie je zjišťována velikost genomu, která obecně vypovídá o fylogenetické vzdálenosti mezi druhy. Blízce příbuzné taxony však mohou mít velikost genomu shodnou. V takových případech je nezbytné pro jejich odlišení využít jiných molekulárních metod, konkrétně analýzu mikrosatelitních oblastí jaderné DNA, jejíž provedení je v rámci započatého projektu také plánováno.

Velikost genomu zcela zásadním způsobem ovlivňuje stupeň ploidie. Této skutečnosti je významně využito při měření velikosti genomu a následné klasifikaci populací v tomto příspěvku, protože bříza bělokorá *Betula pendula* (a také bříza trpasličí *Betula nana*) jsou diploidní taxony, zatímco bříza pýřitá *Betula pubescens* a bříza karpatská *B. carpatica* jsou tetraploidní (Kříž 1990).

Materiál a metodika

V roce 2010 byly v průběhu vegetační sezóny odebrány na zájmových lokalitách vzorky jedinců rodu bříza pro cytometrické analýzy. Zájmové lokality byly vybírány s ohledem na taxon, který se na místě na základě studia literatury (případně na základě konzultace s místními odborníky) vyskytoval. Sledovány tedy byly lokality s výskytem břízy bělokoré (*Betula pendula*), břízy karpatské (*Betula carpatica*), břízy trpasličí (*Betula nana*), břízy skalní (*Betula petraea*) a břízy pýřité (*Betula pubescens* s.str.); viz tab. č. 1. Zavedení zkratk s.str. a s.l. v tomto příspěvku je spíše z důvodu přehlednosti, protože, jak je patrné z kapitoly Výsledky, orientace v rámci drobných tetraploidních druhů bříz je poměrně problematická. V terénu byly odebrány větvičky s asimilačními orgány – 1 větvička na 1 sledovaného jedince. Každá větvička byla vložena do mikrotenového sáčku a označena číselným kódem. Větvičky byly následně ukládány do klimaboxu, aby nedošlo k poškození buněčných jader v souvislosti s teplotními změnami. Sledování jedinci byli zároveň v terénu vyznačeni a zaměřeni pomocí GPS přístroje. Každý jedinec byl také pracovně determinován pomocí morfologických znaků publikovaných v určovacích klíčích.

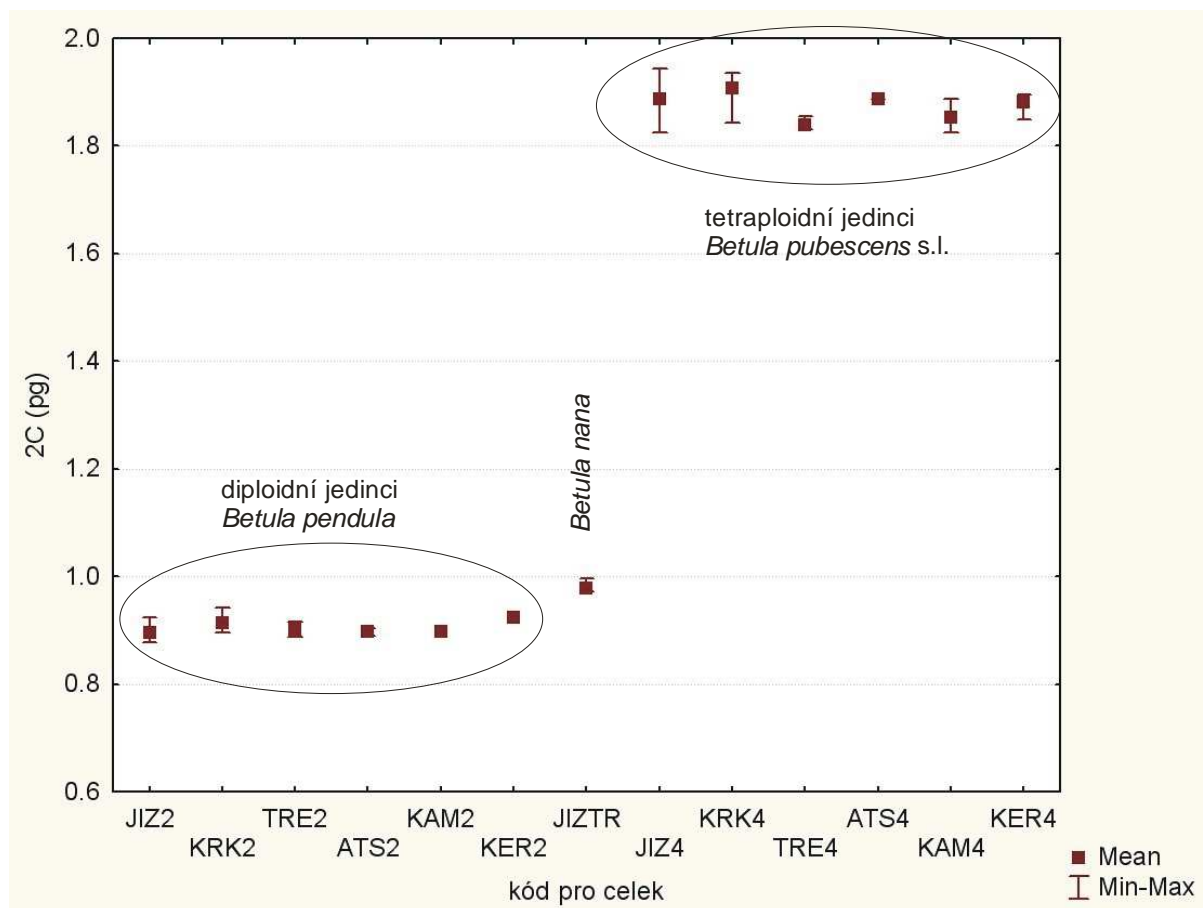
Samotná cytometrická analýza pak probíhala v laboratoři. Laboratorní analýzy byly prováděny do 1 týdne od sběru vzorků z důvodu nutnosti použití čerstvého materiálu. Materiál byl do vlastního zpracování skladován v chladu při teplotě cca 6°C. Příprava suspenze jader pro analýzu spočívala v odběru 1-2 řapíků čerstvých mladých listů z každého studovaného jedince a jejich následného rozsekání pomocí žiletky v Petriho misce spolu s odpovídajícím množstvím listového pletiva sóji, která sloužila jako standard. Do Petriho misky bylo před samotným sekáním přidáno 5 ml vychlazeného hypotonického izolačního roztoku. Vzniklá suspenze byla následně přefiltrována. V rámci optimalizace metodiky bylo nejlepšími výsledky měření dosaženo, pokud se připravený roztok s izolovanými jádry nechal na cca 2-4 hodiny odstát. Před vlastním měřením v průtokovém cytometru Partec CyFlow bylo k jádrům přidáno fluorescenční barvivo. Celkem bylo pomocí této metody analyzováno 188 jedinců rodu bříza pocházejících z různých oblastí ČR (viz tabulka č. 1). Statistické vyhodnocení získaných dat bylo provedeno pomocí počítačového programu STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.).

Tab. 1: Přehled sledovaných oblastí/lokalit s uvedením základních charakteristik / List of surveyed areas/localities and their basic characteristics

Název přírodní lesní oblasti	Kód pro celek	Název oblasti/lokality	Počet analyzovaných stromů v rámci lokality	Prověřovaný taxon (údaje z literárních pramenů)	Poznámka
21 - Jizerské hory	JIZ	Jizerské hory	85	<i>Betula carpatica</i> <i>Betula pendula</i> <i>Betula nana</i>	Velká a Malá jizerská louka, Čínská cesta, Pod Bukovcem, Jizera
22 - Krkonoše	KRK	Krkonoše	73	<i>Betula carpatica</i> <i>Betula pendula</i> <i>Betula pubescens</i> s.str.	Obří důl, Labský důl, Velká a Malá kotelní jáma
17 - Polabí	KER	Kersko	6	<i>Betula pubescens</i> s.str. <i>Betula pendula</i>	východní okraj lesního komplexu
7 - Brdská vrchovina	TRE	Třemšín	6	<i>Betula petraea</i> <i>Betula pendula</i>	kamenné moře na severovýchodním úbočí hory Třemšín
24 - Sudetské mezihoří	ATS	Broumovsko	8	<i>Betula petraea</i> <i>Betula pendula</i> <i>Betula pubescens</i> s.str.	Mádrovka, Černý příkop
6 - Západočeská pahorkatina	KAM	Plzeň - Bolevec	10	<i>Betula pubescens</i> s.str. <i>Betula pendula</i>	rašelinistiště v epilitorálu severozápadně Kamenného rybníka

Výsledky

Pomocí cytometrických analýz bylo možné jednoznačně rozlišit jedince diploidní a tetraploidní. Velikost genomu diploidního druhu *Betula pendula* se pohybovala v rozmezí 0,877 až 0,942 pg (viz graf č. 1). U rovněž diploidního druhu *Betula nana* byla v této studii pozorována velikost genomu v rozmezí 0,972 až 0,995 pg (viz graf č. 1). Odlišnost ve velikosti genomu obou těchto druhů byla sice jen mírná, avšak jednoznačná a signifikantní (viz tab. č. 2). Další analyzované taxony byly tetraploidní. U tetraploidních rostlin se velikost genomu pohybovala v rozmezí 1,825 až 1,943 pg a již nebylo možné pomocí této metody jednoznačně rozlišit jedince příslušející k jednotlivým taxonům (viz tab. č. 2). Proto byla celá skupina tetraploidních rostlin označena jako *B. pubescens* s.l. a zahrnuje taxony *B. carpatica*, *B. pubescens* s.str. a *B. petraea*.



Graf 1: Velikost genomu bříz (2C) pro jednotlivé sledované lokality/taxony (číslice za zkratkou vyjadřuje stupeň ploidie) / Genome size (2C) of separate observed localities/taxa (the numeric character express ploidy levels)

Tab. 2: Výsledky LSD testu porovnávající vzájemně velikosti genomu bříz na jednotlivých lokalitách (tučně vyznačené hodnoty vyjadřují signifikantní rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$) / Results of LSD test comparing mutually the genome size of birch on particular localities (highlighted values show the significant difference at level $\alpha = 0,05$)

kód pro celek	JIZ2	KRK2	TRE2	ATS2	KAM2	KER2	JIZTR	JIZ4	KRK4	TRE4	ATS4	KAM4
JIZ2												
KRK2	0,0231											
TRE2	0,6248	0,3827										
ATS2	0,8549	0,0871	0,7331									
KAM2	0,9243	0,3646	0,8274	0,9916								
KER2	0,1096	0,5967	0,2948	0,1489	0,2732							
JIZTR	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	0,0001	0,0072						
JIZ4	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001					
KRK4	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001				
TRE4	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001			
ATS4	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	0,8833	0,1407	0,0017		
KAM4	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	0,1785	0,0138	
KER4	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	0,5552	0,0022	0,0005	0,6501	0,0056

Jako velmi vhodná metoda pro rozlišení taxonů se průtoková cytometrie ukázala v případech, kdy se u sledovaných jedinců vyskytly přechodné morfologické znaky mezi druhem *Betula pendula* a některým ze zástupců tetraploidních taxonů. Tyto břízy se vyskytovaly na kamenitých nepodmáčených stanovištích v Jizerských horách a ve všech případech bylo zjištěno, že jsou tyto jedinci diploidní, což ukazuje na příslušnost k bříze bělokoré. Na vlhkých až zrašelinělých stanovištích v Jizerských horách nesly sledované břízy znaky, které jsou v literatuře uváděné pro břízu karpatskou

a také průtoková cytometrie ukázala, že se jednalo o tetraploidní jedince. Diploidní jedinci na těchto stanovištích nalezeni nebyli.

Jedinci vykazující morfologické znaky taxonu *B. pubescens* s.str. (lokality Kersko a Kamenný rybník) byli tetraploidní. Diploidní rostliny byly pouze ty, u nichž se vyskytovala jednoznačná převaha morfologických znaků *B. pendula*. Taxonomický význam má zjištění velikosti genomu u bříz s chlupatými listy z kamenných moří (lokality Třemšín), v literatuře uváděných jako *B. petraea*, u nichž bylo v této studii jednoznačně zjištěno, že se jedná o tetraploidní jedince. Tím bylo potvrzeno, že by se tento provizorní taxon měl řadit k *B. pubescens* s.l. (což je pojetí Kříže 1990) a nikoliv k *B. pendula* (což učinil Koblížek 2002). V pískovcových skalních městech severovýchodních Čech, odkud je *B. petraea* také uváděna (Sýkora & Hadač 1984), jsme na skalních hranách při prvním orientačním průzkumu dosud našli pouze diploidní břízy s výraznou převahou znaků *B. pendula*. Je třeba nicméně zdůraznit, že monitoring na velké části území v této oblasti nebyl dosud proveden.

Diskuse

Měřením velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie byli dobře odlišeni diploidní jedinci příslušející k *Betula pendula* a k *B. nana*. Tetraploidní jedinci měli víceméně stejnou velikost genomu (zjištěné odchylky jsou v rámci přesnosti použitého přístroje). Vysvětlením může být, že všechny tyto tetraploidní rostliny jsou pouze velmi variabilními jedinci břízy pýřité (*B. pubescens* s.str.) a bříza pýřitá vytváří různé ekotypy, které jsou označovány různými jmény (horský ekotyp = *B. carpatica*, suťový ekotyp = *B. petraea*). Stejná velikost genomu zkoumaných tetraploidů v rámci *B. pubescens* s.l. však neznámá, že se nemůže jednat o soubor několika druhů. Může se jednat o blízké příbuzné taxony. Může se přitom jednat o několikrát nezávisle na sobě vzniklého křížence stejných rodičů, přičemž pokaždé došlo k předání jiného poměru vlastností jednotlivých rodičů.

V problematice morfologické variability bříz má stěžejní roli křížení jednotlivých druhů a to nejen taxonů stejné ploidie. Křížit se mohou navzájem i diploidní a tetraploidní břízy za vzniku triploidů (Briggs & Walters 2001), což bylo dokázáno na příkladu diploidní *Betula nana* a tetraploidní *B. pubescens* s.str. na Islandu (Thórsson et al. 2007), kde bylo zjištěno vysoké zastoupení triploidů v populacích bříz (9,5 % analyzovaných jedinců). V kontextu s výše uvedeným je velice pozoruhodné, že přestože bylo autorským kolektivem tohoto článku analyzováno značné množství dospělých jedinců (188 stromů), nebyl mezi nimi nalezen žádný triploid. Přitom byla při výběru stromů zaměřena pozornost do značné míry právě na intermediární jedince s přechodnými znaky *B. pendula* – *B. pubescens* s.l. Nelze tedy vyloučit, že zde existuje dosud blíže neznámá reprodukční bariéra, která vzniku kříženců uvedených taxonů brání. Tou může být prostý fenologický posun v kvetení, ale možná i časově velmi vzdálené fylogenetické oddělení jednotlivých taxonů s následnou izolací a mikroevolucí, která znemožňuje křížení v současnosti. Ovšem, varianta, že triploidní jedinci vzácně vznikají (a nebyli dosud nalezeni, vzhledem k tomu, že byly analyzovány stromy rostoucí na dosti extrémních stanovištích, odkud mohou být relativně citlivější triploidi eliminováni, nebo že byli analyzováni pouze jedinci dospělí), je také možná. Tito triploidi, přes jejich naprostou vzácnost, mohou hrát vzhledem k velké produkci pylu klíčovou roli v introgresi. Fungují jakožto donor pylu (tvoří pyl haploidní i diploidní) a mohou proto oplodnit jak diploidní, tak tetraploidní jedince.

Důležité zjištění je, že *B. pubescens* s.l. není autopolyploid od *B. pendula*, protože nemá právě dvojnásobnou velikost genomu velikosti *B. pendula*, ale poněkud větší. To je plně v souladu s výsledky Järvinen et al. (2004), která přináší podpůrné důkazy pro hypotézu, že rodičovskými taxony *B. pubescens* jsou *B. pendula* a *B. humilis*.

Závěr

Použití metody průtokové cytometrie je velmi přínosným nástrojem pro determinaci sledovaných populací bříz. Pomocí ní lze jednoznačně rozoznat jedince druhu *Betula pendula*. Neumožňuje však rozlišení mezi tetraploidními taxony z okruhu břízy pýřité (*B. pubescens* s.str., *B. carpatica*, *B. petraea*). Pro bližší pochopení fylogenetických vztahů v rámci skupiny *B. pubescens* s.l. bude nezbytné využít dalších molekulárních metod (např. mikrosatelitů).

Poděkování

Poděkování patří kolegům z regionů, kteří nám doporučili lokality pro sběr materiálu a pomohli zajistit provedení terénních prací. Jmenovitě se jedná o Vladimíra Vršovského ze správy CHKO Jizerské hory, Aleše Hájka a Petra Kunu ze správy CHKO Broumovsko, Rudolfa Hlaváčka z

Hornického muzea Příbram a Stanislava Vacka z FLD ČZU. Poděkování patří také VÚLHM, který nám umožnil provést odběr vzorků břízy trpasličí na výzkumné ploše.

Tento příspěvek vznikl za podpory grantových projektů Vztah populací břízy karpatské a typu stanoviště ve vrcholových horských polohách - CIGA ČZU (20104308), Funkční potenciál vybraných listnatých dřevin a jejich vnášení do jehličnatých porostů v Jizerských horách - NAZV (QH 92087) a Management biodiversity v Krkonoších a na Šumavě - MŠMT ČR (2B06012).

Literatura

- BRIGGS D. & WALTERS S. M., 2001: Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, p. 531 p.
- CHEN Z. D., MANCHESTER S. R. & SUN H. Y., 1999: Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and palaeobotany. *American Journal of Botany* 86: 1168-1181.
- JÄRVINEN P., PALMÉ A., MORALES L. O., LÄNNEPÄÄ M., KEINÄNEN M., SOPANEN T. & LASCOUX M., 2004: Phylogenetic relationship of *Betula* species (*Betulaceae*) based on nuclear ADH and chloroplast matK sequences. *American Journal of Botany* 91(11): 1834–1845.
- KOBLÍŽEK J., 2002: *Betula* L. – bříza. – In: Kubát K., Hroudka L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. [eds]: Klíč ke květeně České republiky. p. 143-145 – Academia, Praha.
- KŘÍŽ Z., 1990: *Betula* L. – bříza. In: Hejný S. & Slavík B. [eds]: Květena České republiky, 2. díl. Academia, Praha, p. 36-46.
- SUDA J., 2005: Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa* 53/1: 46-48.
- SUDA J. & Pyšek P., 2010: Flow cytometry in botanical research: introduction. *Preslia* 82: 1-2.
- SÝKORA T. & HADAČ E., 1984: Příspěvek k fytogeografii Adršpašsko-Teplických skal. *Preslia* 56: 359-376.
- THÓRSSON Æ. TH., PÁLSSON S., SIGURGEIRSSON A. & ANAMTHAWAT-JÓNSSON K., 2007: Morphological Variation among *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their Triploid Hybrids in Iceland. *Annals of Botany* 99: 1183–1193.

Kontakt

Mgr. Petr Karlík, Ing. Jana Ešnerová

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Katedra dendrologie a šlechtění lesních dřevin, Kamýcká 1176, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, e-mail: karlik@fld.czu.cz, esnerova@fld.czu.cz

Mgr. Tomáš Urfus

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, Benátská 2, 128 01 Praha 2