

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Rod Lophophora J. M. Coult.

I. Taxonomie rodu, izolace DNA a výběr molekulárních markerů pro
biosystematickou studii

Barbora Sasáková

Bakalářská práce
předložená na Katedře ekologie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity palackého v Olomouci

Jako součást požadavků
na získání titulu Bc. v oboru
Ekologie a ochrana životního prostředí

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

Olomouc 2015

Sasáková B. (2015): Rod *Lophophora* J. M. Coult. I. Taxonomie rodu, izolace DNA a výběr molekulárních markerů pro biosystematickou studii. Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 46 pp, v češtině.

Abstrakt

Rod *Lophophora* je rod malých, kulovitých, nenápadných kaktusů rostoucích od jihozápadu Spojených států amerických přes severní Mexiko až po střední Mexiko. V dnešní době se do rodu řadí pět druhů, které jsou rozděleny do dvou sekcí: *Lophophora* sect. *Lophophora* a *L.* sect. *Diffusae*. Do první sekce je řazen jeden vysoce polymorfní druh *L. williamsii*, zatímco do sekce *Diffusae* jsou řazeny zbylé čtyři druhy *L. diffusa*, *L. koehresii*, *L. fricii* a *L. alberto-vojtechii*. Zástupci sekce *Lophophora* se vedle morfologie liší od sekce *Diffusae* i obsahem a složením alkaloidů. Proslulý alkaloid meskalin, vyvolávající silný vizuální halucinace, se tvoří jenom u zástupců sekce *Lophophora* a je tedy charakteristický pro druh *L. williamsii*. Taxonomické zpracování rodu však není jednoznačné a vyvolává mnoho polemik o tom, jestli se v rodě skutečně dá rozlišit pět druhů, nebo existuje jenom jeden morfologicky značně polymorfní druh *L. williamsii*.

Tato bakalářská práce se zaměřila na podrobnou literární rešerši z aktuálních zdrojů, zahrnující morfologický popis, údaje o taxonomii, areálu výskytu a historii rodu *Lophophora*. Praktická část byla zaměřena na izolaci DNA a testování molekulárních markerů pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Celkově bylo zpracováno 151 rostlinných vzorků rodu *Lophophora*, zahrnujících čtyři z pěti popsanych druhů, ze kterých byla vyizolována DNA. Kvalita vyizolované DNA byla ověřena na agarózové elektroforéze a koncentrace byla změřena na NanoDropu. Vhodnost DNA pro další molekulárně-genetické analýzy, byla otestována pomocí PCR reakce, kdy se testovalo pět různých markerů na čtyřech vzorcích s různou kvalitou DNA.

Klíčová slova: izolace DNA, *Lophophora*, PCR reakce, peyotl.

Sasáková B. (2015): Genus *Lophophora* J. M. Coult. I. Taxonomy, DNA isolation and selection of molecular markers for biosystematic study. Bachelor's thesis, Department of Ecology and Environmental, Faculty of Sciences, Palacký University Olomouc, 46 pp, in Czech.

Abstract

The genus *Lophophora* is a genus of small inconspicuous globular cacti, growing from the Southwestern United States through Northern Mexico up to Central Mexico. Nowadays, the genus consists of five species, which are divided into the two sections: *Lophophora* sect. *Lophophora* and *L.* sect. *Diffusae*. The section *Lophophora* includes only one highly polymorphic species *L. williamsii*, while the section *Diffusae* includes remaining four species: *L. diffusa*, *L. koehresii*, *L. fricii* and *L. alberto-vojtechii*. Representatives of the section *Lophophora* differ from the section *Diffusae* in morphology, content and composition of produced alkaloids. Renowned alkaloid mescaline, causing powerful visual hallucinations, is produced only by representatives of the section *Lophophora*. Thus, mescaline is characteristic for the species *L. williamsii*. However, taxonomic treatment of the genus is not clear and raises number of controversy about whether it is possible to distinguish the five species within the genus, or there is only one morphologically highly polymorphic species *L. williamsii*.

This thesis was focused on a detailed literature search of current resources about the genus, including morphological description, information on taxonomy, distribution and history of the genus *Lophophora*. The aim of practical part was isolation of DNA and testing of molecular markers by means of Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA was extracted from 151 samples, comprising four of the five actually described species. Quality of isolated DNA was checked on agarose gel electrophoresis and DNA concentration was measured by Nanodrop. Suitability of extracted DNA for subsequent molecular-genetic analysis was tested with five markers on four samples of different quality, using a PCR reaction.

Key words: isolation of DNA, *Lophophora*, PCR reaction, peyotl.

Prohlášení:

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

V Olomouci dne

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala RNDr. Ľuboši Majeskému, Ph.D. za trpělivost a maximální ochotu a také rodině, kamarádům a spolužákům za jejich poskytnutou podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	3
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
3.1. Botanická charakteristika rodu <i>Lophophora</i>	4
3.1.1. Název, morfologický popis, rozšíření	4
3.1.2. Taxonomie rodu	6
3.1.2.1. Sekce <i>Lophophora</i> Bohata, Myšák et Šnicer	8
3.1.2.1.1. <i>Lophophora williamsii</i>	9
3.1.2.2. Sekce <i>diffusae</i> Bohata, Myšák et Šnicer	10
3.1.2.2.1. <i>Lophophora diffusa</i>	10
3.1.2.2.2. <i>Lophophora fricii</i>	11
3.1.2.2.3. <i>Lophophora koehresii</i>	13
3.1.2.2.4. <i>Lophophora alberto-vojtechii</i>	14
3.2. Etnobotanika <i>Lophophora williamsii</i>	16
4. MATERIÁL A METODY	22
4.1.1. Použité chemikálie	22
4.1.2. Použité roztoky	23
4.1.3. Laboratorní přístroje	25
4.2. Rostlinný materiál.....	26
4.3. Izolace DNA	28
4.4. PCR reakce a testování mikrosatelitových a chloroplastových primerů	31
4.4.1. PCR protokol	33
5. VÝSLEDKY	35
6. DISKUZE	39
7. ZÁVĚR	42
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Použitý rostlinný materiál.	26
Tabulka 2: Protokol pro přípravu PCR premixu.....	33
Tabulka 3: PCR program.....	34
Tabulka 4: Koncentrace a čistota vyizolované genomické DNA	35

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Areál rozšíření rodu <i>Lophophora</i>	6
Obrázek 2: <i>Lophophora williamsii</i>	8
Obrázek 3: <i>Lophophora williamsii</i>	10
Obrázek 4: <i>Lophophora diffusa</i>	11
Obrázek 5: <i>Lophophora fricii</i>	13
Obrázek 6: <i>Lophophora koehresii</i>	14
Obrázek 7: <i>Lophophora alberto-vojtechii</i>	15
Obrázek 8: Sběrač peyotlu z kmene Huichol	17
Obrázek 9: Konzumenti peyotlu z kmene Huichol	19
Obrázek 10: Výsledek agarózové elektroforézy vyizolované genomické DNA	38
Obrázek 11: Výsledek agarózové elektroforézy testovaných markerů	38

1. Úvod

Lophophora J. M. Coult. je početně malý rod zploštělé kulovitých, žebrovitých bezostných kaktusů rostoucích od jihozápadu Spojených států amerických (státy Texas a Nové Mexiko) přes severní Mexiko až po střední Mexiko (státy San Luis Potosí, Queretaro). Navzdory malému počtu druhů, v dnešní době se řadí do rodu *Lophophora* jenom pět druhů, taxonomické nahlížení a nomenklatorické zpracování rodu je dosti komplikované a nejasné. Existuje několik protichůdných názorů na taxonomické postavení jednotlivých druhů (např. Grym 2014). Tyto komplikace způsobuje hlavně malé množství diagnostických znaků použitelných pro určení druhů, značná plasticita v morfologických znacích, variabilita růstových forem a odlišné nahlížení na tyto charakteristiky (Anderson 1969; Bohata a kol. 2005; Rowley 2006).

Až roku 1894 byla *Lophophora* zařazena do samostatného rodu Coulterem. Do té doby byla řazena do různých rodů, např. *Echinocactus* Link & Otto, *Anhalonium* Lemaire, *Ariocarpus* Scheidweiler, atd. Jednotlivé druhy rodu *Lophophora* jsou od sebe velice těžce rozeznatelné. To zapříčinilo kolotoč kolem popisu a pojmenování tohoto rodu. Dlouho se ujímal názor, že rod *Lophophora* lze chápat jako jeden polymorfní druh. Nebylo výjimkou, že rostlina byla během dvou let čtyřikrát přejmenována (Grym 2014).

Avšak, rod *Lophophora* je znám nejenom botanikům a pěstitelům kaktusů, ale i širší laické společnosti. Důvodem je přítomnost alkaloidu meskalinu, látky se silnými psychoaktivními účinky. Silné halucinogenní účinky meskalinu byly a jsou důvodem zneužívání tohoto kaktusu jako narkotika. Hlavním obdobím experimentování s meskalinem a jeho účinky na lidskou psychiku byla šedesátá léta 20. století. Mnoho známých osobností z kulturního života užívalo „peyotl“ kvůli vyvolání silných halucinačních prožitků, např. Jim Morrison (The Doors), Robert Del Naja (Massive Attack), Aldous Huxley, Timothy Leary, Henri Michaux a mnoho dalších. Meskalin je v největším množství zastoupen jenom u

druhu *Lophophora williamsii* (Lemaire ex Salm-Dyck) J.M.Coult. Název tento alkaloid dostal podle severoamerického indiánského etnika Apačů z kmene Meskaleros, od kterých byly získány rostliny, ve kterých byl identifikován tento alkaloid. Alkaloid byl identifikován 23. listopadu 1897 německým chemikem Arthurem Heffterem. Dalším významným alkaloidem, přítomným u lophophor je pellotin, který byl počátkem 20. století užíván jako sedativum a byl izolován z extraktu druhu *Lophophora diffusa* (Croizat) Bravo. S příchodem barbiturátů v roce 1911, jejichž výroba byla méně nákladná, pellotin zmizel z farmaceutického trhu (Perrine 2001). Psychoaktivní účinky *L. williamsii* jsou pravděpodobně známy již více než pět a půl tisíce let (Terry a kol. 2006). Původní obyvatelé Severoamerického kontinentu, považovali a dodnes tuto rostlinu považují za všelék a věří, že pomocí ní dokáží navázat kontakt s bohy. To je hlavním důvodem, proč na sebe v minulosti poutal, tenhle jinak dosti nenápadný kaktus, tak velkou pozornost, která vedla ke snahám dozvědět se o něm co nejvíce. V roce 2005 byla ve speciální příloze časopisu Kaktusy (Bohata a kol. 2005) poprvé uveřejněna ucelená monografie rodu *Lophophora*. Autoři monografie rozdělili rod na dvě sekce. Sekce *Lophophora* s jediným druhem *L. williamsii*, a sekce *Diffusae* obsahující čtyři druhy *Lophophora diffusa*, *Lophophora fricii* Habermann, *Lophophora koehresii* (J. Říha) Bohata, Myšák et. Šnicer, *Lophophora alberto – vojtechii* Bohata, Myšák et Šnicer. Rozdělení do dvou sekcí je obhajováno výraznými rozdíly mezi druhy v obsahu alkaloidů, areálu výskytu, tvaru a počtu žeber, barvou a tloušťkou epidermis atd. (Bohata a kol. 2005).

2. Cíle práce

Cílem této práce je:

- Připravit literární rešerši na téma: Rozšíření, ekologie, taxonomie a etnobotanika rodu *Lophophora*
- Připravit základ pro biosystematickou studii rodu, což zahrnuje:
 - Izolaci DNA z rostlinného materiálu
 - Testování jaderných a chloroplastových molekulárních markerů pro následnou biosystematickou studii

3. Literární přehled

3.1. Botanická charakteristika rodu *Lophophora*

3.1.1. Název, morfologický popis, rozšíření

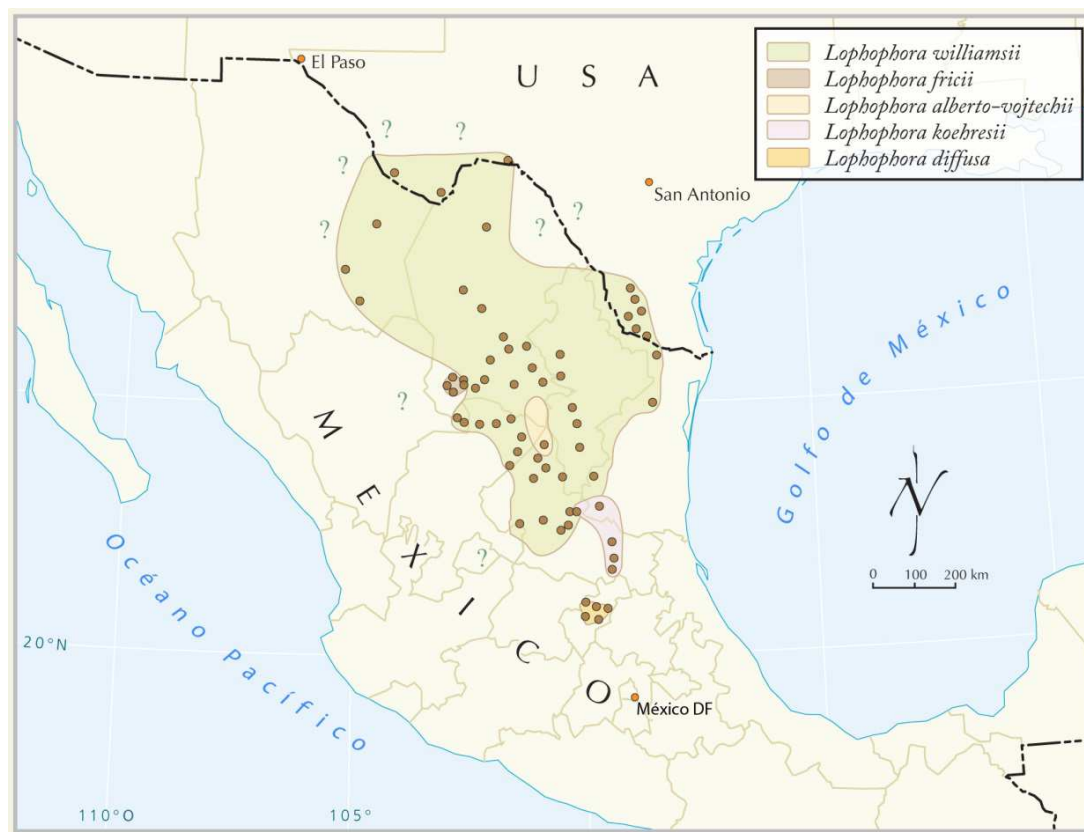
Coulterovo pojmenování *Lophophora* pochází z řeckých slov [*laphos*] a [*phero*], což v doslovném překladu znamená „nosit chochol“. To se vztahuje k chomáčům chlupů rostoucích v areolách namísto trnů.

Lofofory jsou rostliny zploštěle kulovité, hrbolkovité s propadlým středem, rozdělené podélnými žebry na segmenty. Žeber je maximálně 21 a jejich počet se liší podle druhu. Většina kulovitých kaktusů má stabilní uspořádání žeber v počtu Fibonacciho čísel (0, 1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21). Mladé rostliny začínají s pěti žebry. Po dosažení 5 – 6 cm se vyvinou v osm žeber a 13 žeber mají rostliny dospělé, v průměru větší jak 8 cm. Staré rostliny *L. diffusa* a *L. fricii* se často vyvinou v 21 žeber (Terry 2008). Stonek je nízký, solitérní nebo odnožující s dlouhým řepovitým kořenem, který tvoří větší část rostliny. Areoly tvoří hrbolky, z jejichž vrcholů vyrůstají měkké nažloutlé nebo bělavé chomáče trichomů dlouhé 10 – 13 mm. Tvorba trnů je potlačena, vyskytují se pouze u semenáčků. Epidermis je modrozelená, žlutá, zelená nebo někdy načervenalé zelená. Rostliny mohou dosáhnout výšky až 7 cm a průměru do 16 cm. Rostou jednotlivě i ve skupinách. Květy se vytvářejí na areolách v blízkosti temene rostliny. Nálevkovitý tvar květů, jejichž délka dosahuje 10 – 25 mm a 10 – 35 mm v průměru, připomíná korunu. Barva květů může být růžová, fialová, bílá, nažloutlá, nazelenalá nebo načervenalá a závisí na délce kvetení, síle slunečního svitu, zdravotním stavu, množství vody, živinách a podloží, a proto barvu nelze použít k determinaci druhu. Nitky tyčinek jsou bílé, fialové nebo růžové se žlutými prašníky. Blizna je 3-8 klanná, zbarvená stejně jako nitky tyčinek. Plodem je protáhlá bobule dlouhá 8 – 30 mm růžové, bílé, žluté, fialové nebo červené barvy s různými odstíny, závislými na klimatických podmínkách, zdravotní stavu rostliny a stupni zralosti. Barvu plodu můžeme využít při rozlišení místních

populací. Uvnitř plodu je 8 – 40 černých semen hruškovitého tvaru s hrboilatou testou a širokým či stlačeným hilem, 1 – 1.5 mm dlouhé a 1 mm široké (Grym 2014).

Lofofora obývá dvě základní vegetační zóny charakterizované Rzedowskim (Rzedowski 1965 sek. in. Anderson 1969) jako: 1. pouštní křoviny s malým olistěním, kde rostou *Larrea divaricata* (DC) Coville, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC., *Flourensia cernua* DC.; a 2. pouštní křoviny s rostlinami *Agave lechuguilla* Torr. a *Yucca* spp. Další rostliny, se kterými sdílí stanoviště, jsou např. *Jatropha dioica* Cerv., *Echinocereus* spp., *Opuntia leptocaulis* DC., *Echinocactus horzonthalonius* Lem., *Mammillaria* spp., *Acacia* spp., *Coryphantha* spp., *Neolloydia* spp., *Hamatocactus* spp., *Euphorbia antisiphilitica* Zucc., *Koeberlinia spinosa* Zucc., *Tiquilia canescens* (DC) A. Richards a další. Z toho lze usoudit, že lofofora obývá velmi rozmanitá stanoviště. Jedinci mají tendenci růst v částečném zastínění křovinami, avšak růst na přímém slunci také není ojedinělý. Všechny testované půdy, na kterých se lofofora vyskytovala, byly vápencového původu s pH mezi 7.9 a 8.3. Obsahovaly velké množství Ca^{2+} , malé množství Mg^{2+} , stopové množství NH_3 . Ani co se týče klimatu, není tento rod nijak specializovaný. Klimatické podmínky stanovišť se velmi liší v množství srážek 175.5 – 556.9 mm/rok, v maximální 29.1 až 40.2 ° C a minimální teplotě 1.9 – 10.2 ° C a nadmořské výšce cca 50 m n. m. – 1800 m n. m. (Anderson 1969).

Výskyt rodu je z velké části shodný s geologickým celkem Chihuahuašská poušť. V pánevních regionech mezi pohořím Sierra Madre Occidental a Sierra Madre Oriental. Jižně od státu Saltillo se rozsah areálu zužuje, je přerušen horami, a pak se opět rozšiřuje na východ do podhůří Sierra Madre Oriental a na západ do státu Zacatecas až téměř do města San Luis Potosí ve stejnojmenném státě, kde jeho distribuce končí. Z 80% rostou zástupci tohoto rodu na území Mexika a z 20% na území USA. V Texasu v USA je areál vymezený na úzký pás většinou kolem řeky Rio Grande, a Texas je jediný stát s přirozeným výskytem v USA (Bohata a kol. 2005; Grym 2014).



Obrázek 1: Areál rozšíření rodu *Lophophora*. Převzato z: Terry 2008.

3.1.2. Taxonomie rodu

První zmínka o lofoforách pochází od španělského misionáře Sahagúna z roku 1560. Druhý popis rostliny nelze doložit, protože rukopisy shořely, ale předpokládá se, že pochází od španělského přírodovědce Hernándezze, který měl rostlinu popsat jako *Peyotl zacatesensis* Hernández emend. Sotomayor. Toto pojmenování se oficiálně objevilo až v roce 1790 v díle *Historie Plantarum Novae Hispaniae* Vol. III. (1790):70–71. Lemair v roce 1840 zařadil rostlinu do rodu *Echinocactus* jako *Echinocactus williamsii* Lem. (Rouhier: *Le Peyotl.*, 1927:44) bez publikování popisu. Podle všeho, toto pojmenování bylo použito v *Catalogue des cultues des frères Cels*, Paris (1843):19, ale bylo známé a používané již dříve. V díle *Cactus Hortus Dyckensis*, Paris (1845):28 Salm Dyck řadí *Echinocactus williamsii* do skupiny Theloides, která je charakterizována jako *Echinocactus* s vyčnívajícím vrcholky a odlišnými hlízami. Pojmenování zůstalo nezměněno do roku 1859. Engelmann ustavil roku

1856 (Synopsis of the Cactaceae of the territory of the United States and adjacent region v Proceeding of American Academy of Arts and Sciences; III. 1856:259–311, 345–346) rod *Anhalonium* jako podrod rodu *Mammillaria* a o tři roky později zase jako samostatný rod rozdělený do dvou skupin, z nichž jednu tvoří *Anhalonium williamsii* Lem. Rümpl. a druhou ostatní druhy rodu *Anhalonium* (Cactaceae of the boundary. Corrections. 1859:74). V roce 1869 (Sertum petropolitano seu icones et descriptiones plantarum quae horto botanico imperali petropolitano florentino 1869:13.) uveřejnil popis *Echinocactus rapa* Fischer et Meyer ex Regel. Rümpler v roce 1886 (Handbuch der Kakteenkunde ed. 2., 1886:233) opět vrátil pojmenování *Anhalonium williamsii*. Coulter řadí *Anhalonium williamsii* pod rod *Mammillaria* jako *Mammillaria williamsii* (Lem.) Coult, podle podobnosti plodů a tuberkulí v roce 1891 (Contributions from the U. S. national Herbarium Vol. 2., 1891:129). Schumann se opět vrací roku 1894 k pojmenování *Echinocactus williamsii* a téže rok jej Voss zařadil do rodu *Aricocarpus* jako *Aricocarpus williamsii* (Lem.) Voss. V tomtéž roce Coulter popisuje samostatný rod *Lophophora*. Ale ani popis nového rodu nezabránil opětovnému chybnému řazení do různých rodů. Thompson v roce 1898 vytvořil dva samostatné druhy *Lophophora williamsii* a *Lophophora lewinii* (Henn.) (Thompson 1898). Roku 1911 Vaupel rozlišuje rod *Lophophora* na rostliny s modrošedou epidermis a růžovým květem a rostliny se žlutozelenou epidermis a žlutým květem (Vaupel 1911). Další z mnoha revizí, která stojí za zmínku, provedla H. Bravo, uvádí *Lophophora williamsii* var. *echinata* (Croiz.) Bravo a ustavila *Lophophora diffusa* jako samostatný druh (Bravo 1967). Roku 1969 Anderson redukuje rod *Lophophora* na dva druhy, *Lophophora williamsii* a *Lophophora diffusa* (Anderson 1969). Roku 1974 Habermann popisuje *Lophophora fricii* a o rok později *Lophophora jourdaniana* Lewin ex Roeder (Habermann 1974) Rowley na základě názoru o jednom polymorfním druhu vytvořil v roce 1997 novou kombinaci a z *L. diffusa* udělal poddruh *Lophophora williamsii* var. *diffusa*. Podobně Říha v roce 1996 převedl samostatný druh *L. koehresii* na poddruh

Lophophora diffusa var. *koehresii* Říha (Říha 1996). Poslední, pátý druh v rodě *Lophophora alberto-vojtechii* byl popsán jen recentně a to v roce 2008 skupinou tří kaktusářských nadšenců, Bohata, Myšák a Šnicer, kteří se dlouhodobě zabývají zkoumáním rodu *Lophophora* (Bohata a kol. 2008).

Morfologické znaky rodu *Lophophora* naznačují to, že rod obsahuje buď jeden vysoce polymorfní druh *L. williamsii* nebo pět jednotlivých druhů *L. williamsii*, *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii*, *L. alberto-vojtechii* (Bohata a kol. 2005).

3.1.2.1. Sekce *Lophophora* Bohata, Myšák et Šnicer

Sekci tvoří formy druhu *L. williamsii*. Vytváří maximálně 13 obvykle přímých žeber s tuhou pokožkou šedozelené někdy nafialovělé barvy. Květy mají kratší trubku. Zaschnuté zbytky květů zůstávají dlouhou dobu na rostlině. Nejmarkantnějším rozdílem mezi sekcemi je složení alkaloidů v buněčných šťávách. Množství meskalinu v celkových alkaloidech v rostlinách sekce *Lophophora* je 15 – 30%, zatím co množství jedovatého alkaloidu pellotinu 14 – 17%. Koncentrace meskalinu se liší mezi populacemi a také závisí na ročním období, stáří rostliny a typu zkoumané tkáně. Rozdíl v obsahu alkaloidů je také mezi tkání stonku a kořene. Roste na rozsáhlém území (Bohata a kol. 2005; Grym 2014).



Obrázek 2: *Lophophora williamsii*. Převzato z: Bohata a kol. 2005; <http://www.hajek-kaktusy.cz/fotogalerie/lophophora>.

3.1.2.1.1. *Lophophora williamsii*

Je jediným zástupcem sekce. Rostlina dostala jméno podle anglického cestovatele a velvyslance státu Bahíra, sira C. H. Williamse. *Lophophora williamsii* je značně polymorfní druh, který vytváří množství forem se stálými morfologickými charakteristikami.

Jedná se o kulovité na temeni zploštělé rostliny, s tuhou šedo zelenou epidermis a se silnou vrstvou kutikuly (Obr. 2). Žebra jsou svislá v počtu 5 – 13, pokryta výstupky. Květy jsou menší od bílé, po sytě růžovou barvu s krátkou trubkou a jsou lemovány množstvím dlouhých chlupů. Tyčinky jsou bílé a kratší než části květních obalů. Blizna se skládá z pěti laloků růžové barvy. Plod je válcovitý, růžové barvy a nese zbytky okvětí. Semena jsou černá o průměru 1 mm, odlišná od ostatních druhů (Bravo 1967; Bohata a kol. 2005; Grym 2014).

Zástupci sekce rostou na plochých dnech údolí, ale také ve stěnách vápencových skal. Upřednostňuje mírně zastíněná místa a stanoviště s příznivým vodním režimem. Typickou doprovodnou vegetací je *Ariocarpus spp.*, *Ancistrocactus spp.*, *Astrophytum spp.* a další (Bohata a kol. 2005, Grym 2014).

Areál *L. williamsii* se rozprostírá po celé Chihuahuašské poušti, v centrální části je přítomna hojně na okrajích bývá vzácněji. Hlavní těžiště areálu leží na území státu San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo Leon, Zacatecas, Coahuila, Durango, Chihuahua a Texas. V jižní části se svým areálem dotýká areálu *L. koehresii* a v jednom případě se areály prolínají. Na jihozápadě státu Coahuila v okolí městečka Viesca se areál *L. williamsii* stýká s areálem *L. fricii* (Obr. 1) (Bohata a kol. 2005, Grym 2014).



Obrázek 3: *Lophophora williamsii*. Převzato z: Grym 2014.

3.1.2.2. Sekce *Diffusae* Bohata, Myšák et Šnicer.

Sekci tvoří čtyři druhy: *L. diffusa*, *L. fricii*, *L. koehresii* a *L. alberto-vojtechii*. Vytváří maximálně 21 difúzních, zvlněných žeber s tenkou, lehce zranitelnou pokožkou většinou zelené nebo žlutozelené barvy, což ale nemusí platit u *L. fricii*. Květy mají delší trubku, snáze se odlučují a rostliny jsou vždy cizosprašné. Zde je opačná situace složení alkaloidů v buněčných šťávách než v sekci *Lophophora*. Množství meskalinu v celkových alkaloidech sekce *Diffusae* je maximálně 1.3%, zatímco množství jedovatého alkaloidu pelotinu 65 – 88% (Bohata a kol. 2005). Rostliny z této sekce, díky velkému obsahu pelotinu, jsou domorodým kmenem Huichol známy jako „peyotl, který vás uspí“ (Terry 2008). Obývá menší izolované areály (Obr. 1).

3.1.2.2.1. *Lophophora diffusa*

Rostlina byla pojmenována podle postavení žeber [*diffusus*], což latinsky značí rozptýlený. Má větší a plošší stonek se žlutozelenou, měkkou pokožkou. Dorůstá velkých rozměrů. Žebra jsou difúzní a často se rozpadají na jednotlivé hrboly. Obvykle v počtu 13 žeber. Květy mají delší trubku a jsou bílé s odstíny růžové, vzácněji žluté barvy (Obr. 4). Nitky tyčinek jsou bílé

se žlutými prašníky a bílou čnělkou. Blizna je pětilaločná. Plody jsou bílé až tmavě růžové barvy, válcovitého tvaru (Bravo 1967, Bohata a kol. 2005, Grym 2014). Roste podél suchých koryt periodických říček na náplavách nebo břidlicových svazích (Bohata a kol. 2005).

Lophophora diffusa je nejjižněji rostoucí druh rodu. Obývá stanoviště podél říčního systému Rio Extorax ve státě Querétaro (Obr. 1). Areál rozšíření je izolován sopečnými plošinami, které jsou geologicky aktivní a mohou měnit říční systém. Zatím nejsevernější výskyt byl zjištěn na plošině Anáhuac, která se rozprostírá na velké části státu San Luis Potosí a v oblastech přilehlých států Tamaulipas, Zacatecas a Guanajuato. To jsou velmi horké a suché oblasti. Suchu se brání velikostí stonku, a proto častěji roste trsovitě (Bohata a kol. 2005, Grym 2014).



Obrázek 4: *Lophophora diffusa*. Převzato z: Grym 2014.

3.1.2.2.2. *Lophophora fricii*

Lophophora fricii nese jméno po českém cestovateli a kaktusáři Albertu Vojtěchu Fričovi. Tento druh má vekou plasticitu znaků. Je ploše kulovitý, může růst soliterně nebo trsovitě po více kusech. Žebra jsou početná, zřetelná i zcela difúzní, pokryta tenkou pokožkou

žlutozelené až šedozelené barvy v maximálním počtu 21. Květy jsou od bílé po tmavě růžovou barvu (Obr. 5). Červený plod v sobě skrývá semena, která jsou podobná semenům *L. williamsii*, ale liší se tvarem hila a povrchovou strukturou testy (Habermann 1974, Bohata a kol. 2005, Grym 2014).

Roste na svazích a úpatích hor. Může růst i na přímém slunci, ale preferuje ochranu vyšší vegetace např. *Larrea spp.*, *Fouquieria spp.*, *Agave spp.* Další zástupci doprovodné vegetace jsou *Ariocarpus spp.*, *Astrophytum spp.*, *Coryphantha spp.*, *Echinocactus spp.*, *Echinocereus spp.*, *Escobaria spp.*, *Epithelantha spp.*, *Mammillaria spp.*, *Opuntia spp.* a další (Bohata a kol. 2005).

Areál *L. fricii* je poměrně malá oblast okolo městečka Viesca, přesněji Laguna de Viesca, na jihozápadě státu Coahuila (Obr. 1). Zde naráží na areál *L. williamsii* avšak důkazy o prolnutí druhů na přírodním stanovišti nejsou známy. Laguna de Viesca je plochá pánev vyschlé laguny, která je ze všech stran kromě západní obklopena hradbami hor. Ze západní části plynule přechází v Laguna de Meyrán (Bohata a kol. 2005). *Lophophora fricii* tvoří pravděpodobně několik populací, které se liší jak morfologicky, tak charakterem výskytu. Jižně od Viesca rostou ve svazích příkrých kopců ve vápencových trhlinách, jílovitých kapsách a spárách, mají bílý květ a většina rostlin je solitérních (Terry 2008). Severní forma od Zavaleta roste ve volné prachové půdě naplavené uvnitř strží, kde tvoří velké shluky odnožujících rostlin. Tyto populace jsou mezi sebou vzdáleny cca 30 km (Terry 2008). Forma od El Amparo roste na rovinách výše ve svahu a na úpatí kopců. Proti suchu se brání tvorbou větších stonků a volí stanoviště v puklinách, kde voda vzlíná z útrob skal a ve stržích, kudy v období srážek stéká voda (Bohata a kol. 2005).



Obrázek 5: *Lophophora fricii*. Převzato z: Grym 2014.

3.1.2.2.3. *Lophophora koehresii*

Lophophora koehresii je pojmenována po svém objeviteli Gerhardu Köhresovi. Rostlina je kulovitá na temeni zploštělá s tmavě zelenou pokožkou. Roste soliterně a neodnožuje. Žebra jsou zprvu zřetelná, později se rozpadají a mění se v hrboly. Obvykle tvoří 13, výjimečně 21 žeber. Květy jsou velké a mají bělorůžové zbarvení s charakteristickými hnědými proužky a jejich okvětní lístky jsou úzké a dlouhé (Obr. 6). Tyčinky jsou bílé, čnělka obvykle přesahuje úroveň prašníků a je bílé až narůžovělé barvy. Blizna je bílá někdy s nádechem růžové, žluté nebo zelené barvy. Zbytky okvěti odpadávají ještě před dozráním neobvykle kulatého plodu. Plod bývá růžové nebo žlutavé barvy. Také semena se od ostatních druhů liší. Jsou největší a mají odlišnou strukturu testy (Bohata a kol. 2005, Grym 2014).

Roste na rovinách v pánevních dnech v měkkých náplavových sedimentech pod vyšší vegetací např. *Larrea spp.* Zřídka kdy roste na přímém slunci. Před suchem se chrání zatažením stonku pod povrch půdy, má tzv. geofytní růst. V období dešťů kořen natáhne vodu, zvětší objem a rostlinu vytlačí zpět nad povrch půdy. Stanoviště obývá společně

s *Ariocarpus spp.*, *Ancistrocactus spp.*, *Astrophytum spp.*, *Coryphantha spp.*, *Echinocactus spp.*, *Mammillaria spp.*, *Opuntia spp.* a dalšími (Bohata a kol. 2005).

Druh obývá pánev mezi Rio Verde ve státě San Luis Potosí a Tula ve státě Tamaulipas (Obr. 1). Vyhledává méně zasolená místa s jemnou spraší se složkami sádrovce (Bohata a kol. 2005). Na severu svého areálu se stýká s *L. williamsii*, která roste na vápencovém výběžku vzdáleném ne více než 500 m. Rozdíl mezi populacemi je zcela značný jak morfologicky, ekologicky i fytochemicky (Štarha & Kuchyna 1996, Terry, 2008).



Obrázek 6: *Lophophora koehresii*. Převzato z: Grym 2014.

3.1.2.2.4. *Lophophora alberto-vojtechii*

Naposledy popsáný taxon *Lophophora alberto-vojtechii* zahrnuje jména Alberta Vojtěcha Friče a českého kaktusáře Vojtěcha Myšáka. Jedná se o malý druh, maximálně s osmi žebry. Větší část rostliny je ukryta pod zemí. Stonek je plochý nebo mírně vypouklý, zelenošedé někdy nafialovělé barvy. Květy jsou široké, světle růžové s tmavším pruhem táhnoucím se na vnější straně dlouhého okvětního plátku (Obr. 7). Nitky jsou bílé barvy se žlutooranžovými prašníky. Dlouhá čnělka je bílé barvy a nese nažloutlou nebo narůžovělou bliznu. Mírně protáhlý plod, který po čase usychá, je bílé barvy žlutých nebo narůžovělých odstínů. Semena

jsou černá s hrbolatou testou. Hilum má tvar písmena „V“ a je výrazně ohraničeno (Bohata a kol. 2009).

Stanoviště druhu je podobné jako v případě *L. koehresii*. Jedná se o ploché náplavové sedimenty, které souvisí s geofytním růstem typickým pro *L. koehresii* (Bohata a kol. 2009). Prokázaný výskyt je na severovýchodě státu San Luis Potosí severně od Vanegas, jih státu Coahuila, severozápad a severovýchod státu Zacatecas a jižně od San Roberto ve státě Nuevo Leon (Obr. 1). Areál výskytu se skoro dotýká areálu *L. williamsii*, ale není prokázáno jejich prolnutí. Populace *L. koehresii* je vzdálena více než 120 km od nejbližších populací *L. williamsii* (Bohata a kol. 2009, Grym 2014).



Obrázek 7: *Lophophora alberto-vojtechii*. Převzato z: Grym 2014.

3.2. Etnobotanika *Lophophora williamsii*

Užívání peyotlu mezi domorodým obyvatelstvem Mexika má dlouhou tradici sahající až 3660 – 3780 let před Kristem. Peyotl je tedy znám jako psychoaktivní a medicínská rostlina různým etnikům indiánského obyvatelstva více než 5700 let (El-Seedi a kol. 2005). Název peyotl pochází ze španělského [*peyote*], což je přebraná forma slova z aztéckého jazyka Nahuatl [*peyōtl*] a znamená *kokón, zámotek* (Safford 1915). Rituální užívání peyotlu bylo nejvíce rozvinuto mezi mexickými indiány z kmenů Chichimeca, Tarahumara, Cora, Huichol, a mnoha dalšími. První literární zmínky o užívání peyotlu mezi domorodým obyvatelstvem pochází od španělského kronikáře, etnografa, františkánského mnicha Bernardina de Sahagúna. Jako první popsal Sahagún rituální užívání peyotlu mezi Chichimékmi (Safford 1915, Schultes 1938, Schultes a kol. 2001). Nedá se říct, který indiánský kmen objevil psychoaktivní účinky peyotlu jako první, ale předpokládá se, že indiáni z kmene Tarahumara, obývající rozlehlé části, kde tenhle kaktus roste, byli první, kteří ho začali používat. Od nich se užívání rozšířilo mezi kmeny Kora a Huichol a ostatní kmeny Mexika a Severní Ameriky (Schultes 1938, Schultes a kol. 2001).

Co zapůsobilo na indiány tak, že nenápadný kaktus se stal nedílnou součástí života a tradic mnohých kmenů zůstává i nadále záhadou. Jednou z možností, co vedlo lidi k jeho užívání, jsou fantastické vizuální halucinace doprovázeny zostřením vnímání barev. Život indiánů byl vždy velice úzce spjat s vizemi, ve kterých hledali odpovědi na základní otázky bytí. Touha po silných vizích mohla být jedním z faktorů, které ovlivnily rychlé pronikání užívání peyotlu mezi indiánskými kmeny. Rostlina byla považována za dar od bohů, posvátnou medicínu, přinášející silné vize a zprostředkovávající kontakt s nadpřirozeným světem. Druhou možností, proč se užívání peyotlu rozšířilo, jsou jeho léčebné účinky, které jsou vyzdvihovány většinou indiánských kmenů od Mexika až po Kanadu. Není tedy pochyb,

že to byly vizuální halucinace ve spojení s terapeutickými a stimulačními vlastnosti, které sehrály významnou roli při šíření kultu peyotlu (Schultes 1938).

Indiánské kmeny žijící v areálu výskytu lofofory williamsovy podnikaly a dodnes podnikají dlouhé poutě za účelem sběrů peyotlu. Při sběru se uřízne horní nadzemní část, přičemž kořen musí zůstat nepoškozen kvůli regeneraci rostliny. Nasbírané nadzemní části jsou pak důkladně usušeny na slunci. Usušeným nadzemním částem se říká *peyote buttons* anebo *mescal buttons*. Usušené „peyotlové knoflíčky“ se pak mohou skladovat dlouhou dobu nejčastěji v plátěných pytlích (Schultes a kol. 2001). Kmeny žijící mimo areál výskytu lofofory, udržovaly obchodní styky s kmeny, které žily, a sbíraly peyotl v jeho areálu. Nejčastější formou, v jaké se peyotl užíval/užívá, jsou právě „sušené peyotlové knoflíčky“, které se polykají, avšak bylo zdokumentováno i užívání čerstvých rostlin. Průměrný počet konzumovaných rostlin se velice liší a závisí od účelu, pro jaký jsou určeny. Při obřadech, pro které je nutno dosáhnout silných halucinací, je průměrný počet spolykaných „knoflíků“ 30 (Schultes 1938).



Obrázek 8: Sběrač peyotlu z kmene Huichol. Převzato z: <http://marcdozier.com/portfolio/huichol-mexico/>

V době kdy přišli španělští dobyvatelé do Mexika, byl medicínsko-religiózní kult peyotlu už dávno plně rozvinut. V zápisech dobových kronikářů se vzpomíná užívání peyotlu zejména při léčitelských obřadech na léčení různých nemocí a jako stimulační a tonizující prostředek (Safford 1915, Schultes 1938). Peyotl byl nebo stále je užíván na léčení různých nemocí nebo zranění, jako je např. revmatismus, tuberkulóza, povrchové zranění kůže, popáleniny, uštknutí hadem nebo škorpiónek, atd. Při léčení se používá buď povrchově, nebo se z něho připravují různé odvary. Mnoho indiánských kmenů (např. Tarahumara, Zacatecas, Kiowa, Apachi Mescalero, atd.) věří, že konzumace peyotlu podporuje dlouhověkost. Lofofora williamsova byla dokonce oficiálně zařazena do seznamu medicínsky významných léčiv *Farmacopia Mexicana* (Schultes 1938). Užívání peyotlu během náboženských obřadů bylo zaznamenáno v průběhu dobývání Ameriky. Mnoho kmenů si zachovalo a dodnes udržuje mnoho rituálů, během kterých se konzumují peyotlové knoflíčky (Safford 1915, Schultes a kol. 2001). Tyto ceremonie zahrnují např. celonoční tančení a zpěv, kdy zúčastnění tvoří kruh a následují rytmus bubnů, to je však jen část ceremonií, které se jinak od sebe velmi liší. Mezi nejznámější ceremonie patří obřady „Cross Fire way“, „Half Moon ceremony“, „Sweat Lodge ceremony“, „Sun Dance ceremony“ a často také „Vision Quest“ (Stewart 1987). Peyotismus měl a má sjednocující vliv pro indiánský život, zajišťující přátelství, rituály, společenská setkávání, cestování, manželství a další. Byl zdrojem léčení, mocným ochráncem, který přináší štěstí. Huicholové věří, že pokud má muž u pasu kousek peyotlu, medvěd ho nemůže kousnout a jelen, kterého Huicholové nazývají posvátným bratrem, před ním nemůže utéct. Dodnes se u Huicholů zachoval obřad sběru peyotlu, kdy je napodobován hon a lov s oštěpy a šípy na jelena. Za jelenem se však ve skutečnosti skrývá peyotl. Rituální sběr se řídí přísnými pravidly, která zůstala nezměněna tisíce let (Schultes a kol 2001).

Od začátku objevení Ameriky, katolická církev vnímala užívání peyotlu velice negativně, a všemožně se snažila tenhle zvyk vykořenit z Nového světa. Církev se bála, že by se peyotl

rozšířil mezi již konvertované indiány i mezi některé Španěly. V roce 1620 vydala inkvizice dekret o zákazu užívání peyotlu. Původní užívání však pokračovalo i mezi pokřesťanštěnými. Navzdory snahám katolické církve vykořenit užívání peyotlu, jeho využívání vzkvétalo hlavně v kmenech v areálu výskytu i mnohem dál na sever. Záznamy potvrzují, že individuální i ceremoniální využití přesahovalo přirozený areál výskytu. Osmnácté století přineslo velké změny pro Mexiko. Španělé, kteří drželi území od 16. století, ztratili kontrolu nad Mexikem roku 1821. V Mexiku následovalo století nepokojů, revoluce, války se Spojenými státy a Francií, další revoluce a diktátorství. Mnoho indiánských kmenů vymizelo nebo zmizelo vlivem civilizace. Na území dnešního Mexika bylo katolictví stanoveno jako náboženství lidu, které nahrazovalo náboženství původní. Ty kmeny, které přežily do 20. století, si vlivem církve vyvinuly odlišné peyotlové ceremonie (např. kmeny Huichol, Tarahumara, Cora, Tepehuan, Tepecano) (Stewart 1987).



Obrázek 9: Konzumenti peyotlu z kmene Huichol. Převzato z: <http://www.mundo-geo.es/naturaleza/paisajes/de-alaska-a-argentina-la-ruta-panamericana?image=5>.

Ceremonie vzniklé ve Spojených státech jsou odlišné od těch v severních horách středního Mexika, avšak mají podobné zvyklosti. Je mnoho podobností mezi starým mexickým pojetím

přeneseným do moderního amerického peyotlového náboženství. Na přelomu 19. a 20. stol. byli domorodí Američané nuceni se začlenit do systému, byla jim zabírána půda a upadali do chudoby a alkoholismu. Příchod peyotlu byl vnímán jako spása indiánů, záchrana tradic a jako most mezi minulým a přítomným. V téhle, pro indiány velice těžké době, se začaly formovat základy nového synkretického náboženství domorodého obyvatelstva, Americká domorodá církev (Native American Church, NAC). Jedná se o hnutí, ve kterém se mísí tradiční domorodá víra spolu s křesťanstvím. Hnutí se začalo formovat v 80. letech 18. stol. a oficiálně bylo založeno v Oklahomě roku 1918 (Wikipedia, The Free Encyclopedia). Mnohokrát se úřad pro indiánské záležitosti (BIA) snažil peyotl zakázat, a proto se spojil s několika církevními organizacemi a organizacemi pro asimilaci Indiánů, jako např. asociace pro indiánské právo a společně tlačili na zákonodárce jednotlivých států za oficiální zákaz. Často byli přizváni uznávaní lékaři, aby často bez pozorování a výzkumu označili peyotl, jako drogu ohrožující morálku. Přirovnáním NAC k Opiové křesťanské církvi či ke Kokainové společnosti křesťanů vedlo roku 1922 k úspěchu BIA a k zákazu užívání peyotlu v několika státech USA. Zákaz dočasně ohrozil existenci první NAC v Oklahomě. Aby se mohli indiáni užívající peyotl odvolávat na první dodatek americké ústavy garantující náboženskou svobodu, museli jednat se státními úřady jako oficiálně zaregistrovaná organizace (církev). V roce 1978 byl schválen zákon, tzn. American Indian Religious freedom act (42 U.S.C. § 1996), kongresem USA, který zaručuje indiánům svobodné praktikování náboženství a užívání jejich posvátných předmětů. Po činnosti indiánských aktivistů došlo k úpravám tohoto zákona v letech 1993 a 1994, ve kterých potvrzují legalitu tradičních indiánských náboženských praktik, pokud není prokázána veřejná úhona. Zákon nebyl dokonalý a nespécifikoval konzumaci peyotlu během náboženských obřadů, a proto byl roku 1994 schválen a americkým prezidentem Billem Clintonem podepsán zákon legalizující užívání peyotlu domorodým obyvatelstvem. Zákon říká že: „Použití, držení nebo přeprava peyotlu

bez ohledu na jakákoli jiná ustanovení právních předpisů, ze strany indiánů pro tradiční slavnostní účely v souvislosti s praxí tradičního indiánského náboženství je legální a nemělo by být zakázáno Spojenými státy nebo jinými státy. Žádný Indián nesmí být penalizován nebo diskriminován na základě takového použití, držení nebo přepravy, včetně, ale ne pouze, popření jinak platných výhod v rámci programů veřejné podpory (42 U.S.C. 1996A(b)(1)). Indiánským kmenem se rozumí jakýkoli kmen, kapela, národ, pueblo nebo jiná organizovaná skupina indiánů včetně aljašské domorodé vesnice, která je uznána jako způsobilá pro speciální programy a služby poskytované Spojenými státy pro indiány a pro jejich indiánský status. Indiánským náboženstvím je myšleno náboženství, které je prováděno indiány, původem a výkladem, který je v rámci tradiční indiánské kultury či komunity (42 U.S.C. 1996A(c)). Zatím co roku 1922 bylo v USA zhruba 13 000 až 22 000 rituálních uživatelů peyotlu, dnes NAC zahrnuje okolo 50 kmenů a 250 000 věřících a zabírají území od Kanady až po západní a střední Mexiko. NAC je dnes nejrozšířenější náboženství mezi domorodými Američany ve Spojených státech, Kanadě a Mexiku (Stewart 1987; Palatová 2005).

4. Materiál a metody

4.1.1. Použité chemikálie

- Octan sodný (NaOAc) (TAMDA)
- Agaróza (SERVA)
- β -merkptoetanol (β -ME) (Sigma-Aldrich)
- Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs) (Promega)
- Destilovaná voda
- Etanol 96% (Lachner)
- Etylendiaminotetraacetát disodný (Na_2EDTA) (VWR)
- GelRed (Biotum)
- GoTaq DNA polymeráza (Promega)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lachner)
- Chloroform (Lachner)
- Isoamylalkohol (Lachner)
- Isopropanol (Lachner)
- Kyselina boritá (H_3BO_3) (Lachner)
- Kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Kyselina octová (Lachner)
- Polyvinylpyrolidín (PVP) (Sigma-Aldrich)
- RNáza (Biobasic)
- Sorbitol (Sigma-Aldrich)
- Trishydroxymetylaminometan (TRIS) (Sigma-Aldrich)

4.1.2. Použité roztoky

3 % CTAB

- 20 ml 1M Tris, pH=8
- 8 ml 0.5M EDTA, pH=8
- 6 g CTAB
- 35.06 g NaCl
- Doplňit destilovanou vodou do 200 ml

70% Etanol (EtOH)

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

80% Etanol (EtOH)

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

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

- 4 ml isoamylalkoholu
- 96 ml chloroformu

Roztok octanu sodného (NaOAc)

- 24.6 g NaOAc
- 50 ml destilované H₂O
- Kyselina octová pro upravení pH na 5.2
- Doplňit destilovanou vodou do 100 ml

Sorbitolový pufr

- 100 ml destilované vody
- 20 ml 1M Tris, pH=8
- 2 ml 0.5M EDTA, pH=8
- 12.76 g sorbitolu
- Doplnit destilovanou vodou do 200 ml

10X TBE pufr:

- 108 g trishydroxymethylaminometanu (Tris)
- 55 g H_3BO_3
- 40 ml 0.5M Na_2EDTA , pH=8
- Rozpustit v 900 ml destilované vody
- Doplnit do 1 l destilovanou vodou

4.1.3. Laboratorní přístroje

Centrifuga Eppendorf[®] 5804 R (Eppendorf)

Digestoř (Merci)

Dokumentační systém Fire-Reader V4 (UVITEC Cambridge)

Elektroforéza OWL A6; Easy Cast OWL B1 (Thermo Scientific)

Flowbox PV-100 (Telstar)

Homogenizátor Fastprep[®] 24 (MP Biomedical)

Laboratorní váha PM 2000 (Mettler-Toledo)

Míchačka s magnetickým ohřevem VMS-C7 (KRD)

Mikropipety Eppendorf, 0.1 – 1000 µl (Eppendorf)

Nanodrop NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)

Sušírna (Chirana)

Termomixér Mixing Block MB-102 (Bioer)

Vortex MS2 mini; MS3 basic (IKA)

Výrobník ledu (Bar Line)

4.2. Rostlinný materiál

Vzorky rostlin pro biosystematický výzkum byly poskytnuty sběrateli a pěstiteli kaktusů Vojtěchem Myšákem, Jaroslavem Bohatou a Jaroslavem Šnicerem z jejich sbírky. Rostlinný materiál představovaly odřezky nadzemních částí rostlin, které byly označeny ID číslem, uloženy do uzavíratelného pytlíčku a uchovávaný při teplotě – 80°C. Seznam použitých rostlin je uvedený v Tabulce 1.

Tabulka 1: Použitý rostlinný materiál

ID číslo	Druh	Původ (federální stát/země)	Počet jedinců	DNA extrakce
1	WILL	Zacatecas (MEX)	2	+
2	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
3	FRI	n.a.	1	+
4	ALV	San Luis Potosí (MEX)	3	+
5	WILL	San Luis Potosí (MEX)	4	+
6	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
7	ALV	San Luis Potosí (MEX)	1	+
8	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
9	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
10	WILL	Nuevo León (MEX)	2	+
11	WILL	Coahuila (MEX)	3	+
12	WILL	Coahuila (MEX)	4	+
13	WILL	Nuevo León (MEX)	2	+
14	WILL	Coahuila (MEX)	1	+
15	WILL	Coahuila (MEX)	1	+
16	ALV	n.a.	6	+
17	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
18	WILL	Nuevo León (MEX)	2	+
19	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
20	WILL	Zacatecas (MEX)	4	+
21	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
22	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
23	WILL	Coahuila (MEX)	4	+
24	ALV	San Luis Potosí (MEX)	3	+
25	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
26	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
27	WILL	Coahuila (MEX)	2	+

ID číslo	Druh	Původ (federální stát/země)	Počet jedinců	DNA extrakce
28	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
29	ALV	San Luis Potosí (MEX)	1	+
30	ALV	Nuevo León (MEX)	2	+
31	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
32	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
33	WILL	Zacatecas (MEX)	2	+
34	WILL	Nuevo León (MEX)	2	+
35	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
36	WILL	Coahuila (Coah.)	4	+
37	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
38	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
39	WILL	Nuevo León (MEX)	2	+
40	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
41	WILL	Zacatecas (MEX)	2	+
42	WILL	Chiapas (MEX)	1	+
43	WILL	Coahuila (MEX)	3	+
44	WILL	Nuevo León (MEX)	2	+
45	n.a.	San Luis Potosí (MEX)	2	+
46	n.a.	San Luis Potosí (MEX)	3	+
47	WILL	San Luis Potosí (MEX)	7	+
48	WILL	Zacatecas (MEX)	2	+
49	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
50	WILL	San Luis Potosí (MEX)	2	+
51	WILL	San Luis Potosí (MEX)	3	+
52	WILL	Coahuila (MEX)	1	+
53	WILL	Coahuila (MEX)	2	+
54	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
55	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
56	WILL	Durango (MEX)	2	+
57	WILL	Zacatecas (MEX)	2	+
58	WILL	Zacatecas (MEX)	1	+
59	WILL	n.a.	1	+
60	WILL	n.a.	2	+
61	WILL	Coahuila (MEX)	1	+
62	WILL	Coahuila (MEX)	1	+
63	WILL	Chihuahua (MEX)	1	+
64	WILL	n.a.	1	+
65	WILL	Texas (USA)	1	+
66	WILL	n.a.	1	+

ID číslo	Druh	Původ (federální stát/země)	Počet jedinců	DNA extrakce
67*	WILL	Zacatecas (MEX)	1	+
68*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
69*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
70*	WILL	Coahuila (MEX)	1	+
71*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
72*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
73*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
74*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
75*	WILL	Chihuahua (MEX)	1	+
76*	WILL	San Luis Potosí (MEX)	1	+
77*	KOE	San Luis Potosí (MEX)	1	+
78*	WILL	n.a.	1	+
79*	FRI	z kultury (n.a.)	1	+

WILL – *Lophophora williamsii*; FRI – *L. fricii*; KOE – *L. koehresii*; ALV – *L. alberto-vojtechii*; n.a. – chybějící informace; MEX – Mexiko; USA – Spojené státy americké, * – sušené vzorky.

4.3. Izolace DNA

Cílem izolace nukleových kyselin je extrakce čisté nerozštěpené DNA bez příměsí RNA, bílkovin nebo sekundárních metabolitů. Prvním krokem je homogenizace pletiva a lýze buněk z jader kterých získáme nukleovou kyselinu. U živočišných buněk stačí rozpustit biomembrány a denaturovat proteiny, kdežto u rostlinných buněk musíme použít formu mechanické síly na rozbití buněčné stěny. Buněčný obsah se uvolní do pufráčního roztoku, který kromě jiného obsahuje i etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). Ta zapříčiní vychytání vápníku, čímž zabráníme rozštěpání DNA nukleázami. CTAB je detergent, který uvolňuje DNA z membrán a proteinů. V dalším kroku extrakce se pak používá chloroform, který denaturuje proteiny, rozpouští tuky a odděluje vodní a organickou fázi. Supernatant je vodní fáze s extrahovanou DNA, v organické fázi se nachází rostlinné metabolity. Následně je potřeba DNA vysrážet v etanolu nebo isopropanolu a promýt. Nakonec se DNA rozpustí ve vodě nebo vhodném pufru a přidáním enzymů (proteináza, RNáza) se odstraní případná vyizolovaná RNA. Metod izolace DNA je celá řada. Volba metody závisí na typu DNA,

kteřou chceme extrahovat, také na typu pletiva ze kterého DNA izolujeme, nebo rostlinného druhu.

Získat čistou nefragmentovanou DNA z kaktusů je docela náročné, hlavně kvůli vysokému obsahu sekundárních metabolitů (zejména polysacharidů), které se při extrakci srážejí společně s DNA a vytvářejí těžkorozpusťitelné shluky. Protokol, vhodný pro extrakci DNA z druhů rodu *Lophophora*, byl otestován a upraven vedoucím mé práce Dr. Majeským. Jako nejvhodnější se ukázal být protokol použitý v práci Russell a kol. (2010). V protokolu jsou použity dva puřry, nejprve se zhomogenizované pletivo zbavuje polysacharidů v sorbitolovém puřru, samotná extrakce DNA pak probíhá v 3% CTAB puřru.

Rostlinné pletivo (cca. 0.5 g) bylo homogenizováno v tekutém dusíku nebo v homegenizátoru. Po zhomogenizování bylo ke každému vzorku napipetováno 1000 μ l sorbitolového puřru s přídavkem PVP a 0.5 μ l β -Me a vzorek byl vortexován 1 až 2 min. Následně byly vzorky centrifugovány při teplotě 10°C, 15 min/13tis. otáček. Supernatant byl odpipetován a předchozí postup, již bez přídavku β -Me a PVP, tudíž pouze se sorbitolovým puřrem, se opakoval, dokud supernatant nepřestal být viskózní (min. 4 krát). V případě homogenizace v homogenizátoru, bylo rostlinné pletivo homogenizováno s již přidaným sorbitolovým puřrem. Když už supernatant přestal být viskózní, bylo k homogenizátu přidáno 1000 μ l 3% CTAB puřru, směs byla krátce zvortexována a při teplotě 60°C se vzorky nechaly inkubovat v termobloku minimálně 60 minut. Poté byly vzorky zcentrifugovány při 10°C 15min/13tis. otáčkách. Po centrifugaci byl supernatant přepipetován do nových 2 ml mikrozkuřavek (ependorfek). K supernatantu bylo přidáno 700 μ l směsi Chl:IAA (chloroform:isoamylalkohol, 24:1). Směs se krátce zvortexovala a nechala se stát 5 minut při pokojové teplotě a opět se zcentrifugovala, 10°C 15min/13tis. otáček. Tento postup byl zopakován ještě jednou. Po druhém centrifugování byl supernatant přepipetován do nových 1.5 ml ependorfek. K odměřenému objemu supernatantu byla přidána 1/10 objemu NaOAc a 2/3

objemu isopropanolu. DNA se nechala precipitovat v lednici při 4°C minimálně 60 minut. Po precipitaci, byly vzorky zcentrifugovány při 10°C 10 min/13tis. otáčkách. Supernatant byl opatrně slit tak, aby pelet vysrážené DNA zůstal na spodu ependorfky. Vysrážený pelet byl pročištěn 500 μ l 70% EtOH, centrifugován při 10°C 10 min/13tis. otáčkách, opatrně slit, opětovně pročištěn 80% EtOH, centrifugován 10°C 15min/13tis. otáčkách a slit. Získaný pelet byl vysušen ve vakuové sušičce při 40°C. Po usušení byl pelet rozpuštěn ve 100 μ l destilované vody. Pro odstranění RNA byl k rozpuštěnému peletu přidán 1 μ l RNAázy (10 mg/ml) a směs byla inkubována při 37°C, 30 minut. Kvalita DNA byla ověřena na 1.8% agaróze (agarózovou elektroforézou), koncentrace a čistota DNA byla změřena na NanoDropu. Protokol byl postupně upravován podle potřeby.

4.4. PCR reakce a testování mikrosatelitových a chloroplastových primerů

Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) se běžně využívá v molekulární biologii za účelem amplifikace určitého úseku DNA. PCR je biochemická reakce, kdy dochází ke kopírování DNA pomocí enzymu DNA-polymerázy. Podle templátu jednovláknové DNA je DNA-polymeráza schopna syntetizovat komplementární vlákno tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru od 5' konce DNA ke 3' konci DNA. K tomu je potřeba kromě templátového vlákna a nukleotidtrifosfátů krátký existující úsek druhého vlákna, tzv. primer, který může být syntetizován uměle jako oligonukleotid. Pokud známe sekvenci templátového vlákna, můžeme si připravit primer, který bude za vhodných teplotních podmínek tvořit vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákně, tedy hybridizovat. Tím určíme DNA-polymeráze, kde má nasedat a kterým směrem má syntetizovat komplementární vlákno. Podle jednoho templátového vlákna nedojde k řetězovému hromadění produktu, proto se používají dva primery, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vlákních. Templátová vlákna vznikají denaturací dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají templáty pro nový reakční cyklus. Máme-li tedy teoreticky na začátku k dispozici dvě templátová vlákna (jednu dvojevláknovou molekulu), pak vzniknou v prvním cyklu dvě kopie. Pro další cyklus máme k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou 4 kopie. Celkem osm templátových vláken slouží v dalším cyklu k syntéze dalších osmi vláken, takže se produkt hromadí geometrickou řadou. Protože je nejdříve potřeba denaturovat templátovou DNA za vysoké teploty, musíme při PCR používat termostabilní polymerázu, která je získávána z hlubokomořských bakterií žijících kolem podmořských sopek a které jsou schopné po určitou dobu odolávat teplotám

kolem 95°C. Pro každou PCR musíme navrhnout vhodný pár primerů pro amplifikaci konkrétního úseku templátové DNA. Musíme docílit toho, aby oba primery nasedaly jen na přesně komplementární sekvenci templátové DNA za stejné teploty (tzv. annealingové teploty) tzn., že musí mít přibližně stejnou teplotu tání. Teplota tání je závislá na délce molekuly a poměru G-C párů a A-T párů bází v sekvenci primeru, protože mezi G-C je o jeden vodíkový můstek více. Teplotu tání lze vypočítat nebo zjistit experimentálně. Dalším požadavkem na primery je, že nemohou tvořit takzvané dimery a vlásenky. Dimer vzniká spárováním dvou primerů a příčinou je delší komplementární úsek v sekvenci obou primerů. Vlášenka vzniká spárováním konců stejného primeru, pokud je mezi nimi velká komplementarita. Oboje má za následek, že PCR nemusí proběhnout, nebo je reakce nespecifická. Primery můžeme navrhnout manuálně nebo za použití různých softwarů.

Marker je známá sekvence DNA, kterou lze jednoduše identifikovat. Buď se jedná o část DNA se změnou jednoho páru bází nebo delší repetitivní úsek tzn. mikrosatelit. Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice jednoduchých sekvencí. Mají vysokou variabilitu, velkou početnost a jsou rozmístěny po celém genomu. Jaderné mikrosatelity (SSRs) jsou nejlepšími markery pro zhodnocení variability na populační úrovni, je zapotřebí druhově specifických primerů tzn. primery specifické pro studovaný druh nebo rod. Chloroplastové mikrosatelity (cpDNA SSRs) jsou vhodné pro zhodnocení variability na úrovni příbuzných druhů nebo na vnitrodruhové úrovni a jsou k dispozici univerzální primery. Chloroplasty jsou organely, které obsahují vlastní DNA (označována jako cpDNA). Chloroplastová DNA má jednoduchou a stabilní strukturu. Výhodou cpDNA je, že v organismu se vyskytuje jenom v jednom typu, tj. je tzv. haploidní. Chloroplastová DNA podléhá jen velice ojediněle rekombinacím a dědí se jenom po jedné linii, u krytosemenných rostlin se většinou dědí po mateřské linii. Výše popsaná specifika chloroplastové DNA ji

předurčují jako vhodný marker pro studium fylogeneze a mezidruhových vztahů na úrovni populací a regionů (např. Palmer 1987).

4.4.1. PCR protokol

Při přípravě PCR reakce je důležité mít dobře rozmražené a promíchané všechny komponenty reakce a templátovou DNA. Samotná příprava reakce probíhala ve Flowboxu, aby se zabránilo případné kontaminaci. Všechny komponenty reakce byly po rozmražení a promíchání udržovány na ledu. Nejprve byl připraven PCR premix, pozůstávající ze všech komponentů reakce (sterilní destilovaná voda, PCR pufr, volné nukleotidy, primery, DNA polymeráza). Premix byl následně rozpipetován do reakčních mikrozkušavek. Jako poslední byla přidána templátová DNA. Po smíchání premixu s templátovou DNA byla směs krátce stočena na mikrocentrifuze a mikrozkušavky byly vloženy do cycleru a byl spuštěn příslušný program pro PCR reakci. Po skončení PCR programu byla úspěšnost reakce ověřena pomocí agarózové elektroforézy.

Pro testování markerů byly vybrány 2 chloroplastové úseky *trnL-trnF* (Taberlet a kol. 1991), *matK* (Dunning a Savolainen 2010), jeden jádrový úsek *ITS1-5.8S-ITS2* (White a kol. 1990) a dva mikrosatelitové lokusy LOP1, LOP2 (Terry 2005). Těchto pět markerů bylo testováno na čtyřech vzorcích (vzorky č. 3, 4A, 5B, 10A). Pro negativní kontrolu (tzv. blank) sloužila sterilní destilovaná voda.

Tabulka 2: Protokol pro přípravu PCR premixu. Uvedené objemy platí pro přípravu 1 vzorku.

Komponent PCR reakce	Pipetován objem	Původní koncentrace/výsledná koncentrace
Sterilní dH ₂ O	9.3 µl	---
Reakční pufr	3 µl	5X/1X
dNTPs	0.3 µl	10 mM/0.2 mM
Přímý primer	0.6 µl	10 µM/0.4 µM
Zpětný primer	0.6 µl	10 µM/0.4 µM
GoTaq DNA polymeráza 5U/µl	0.2 µl	1U
Templátová DNA	1 µl	~ 10 – 20 ng
Výsledný objem	15 µl	---

Tabulka 3: PCR protokol

1:	94°C	5 min	
2:	94°C	30 sek	←
3:	T _a	1 min	┌
4:	72°C	1 min	└
5:	72°C	10 min	
6:	4°C	neomezeně	

PC

T_a – teplota nasedání primerů (annealingová teplota)/PC – počet cyklů reakce; T_a^{matK} = 48°C/PC = 34, T_a^{trmL-trmF} = 52°C/PC = 35; T_a^{ITS, LOP1, LOP2} = 56°C/PC = 35.

5. Výsledky

DNA byla vyizolována celkově ze 151 rostlinných vzorků, z toho bylo 13 vzorků sušených, zbytek byly vzorky zmražené. Izolace DNA z jedinců rodu *Lophophora* byla prováděna náročnější metodou pro dosažení co nejčistší DNA bez sekundárních metabolitů. Po ověření kvality a integrity DNA pomocí agarózové elektroforézy se dá říct, že izolace čisté DNA bez příměsí nebyla u všech vzorků zcela úspěšná (Obr. 10). Jen u malé části vzorků lze vidět nefragmentovanou DNA, u ostatních vzorků pozorujeme hodně fragmentovanou DNA nebo DNA s velkým množstvím polysacharidů obalujících DNA. To způsobilo, že DNA se v průběhu elektroforetické separace nehnula z jamky, ale svítí uvnitř. U vyextrahované DNA byla také změřena její koncentrace a čistota (Tab. 4). I přes to, že u některých vzorků jsem naměřila záporné hodnoty, byla koncentrace nukleových kyselin u většiny vzorků dostatečná (Tab. 4). Čistotu DNA ovlivňují sekundární metabolity a proteiny. Čistota DNA je u převážné většiny vzorků v normě. Poměry absorbancí 260/280 vyjadřují míru znečištění proteiny a poměry absorbancí 260/230 vyjadřují kontaminaci různými nízkomolekulárními organickými látkami, v tomto případě se zřejmě jedná hlavně o polysacharidy.

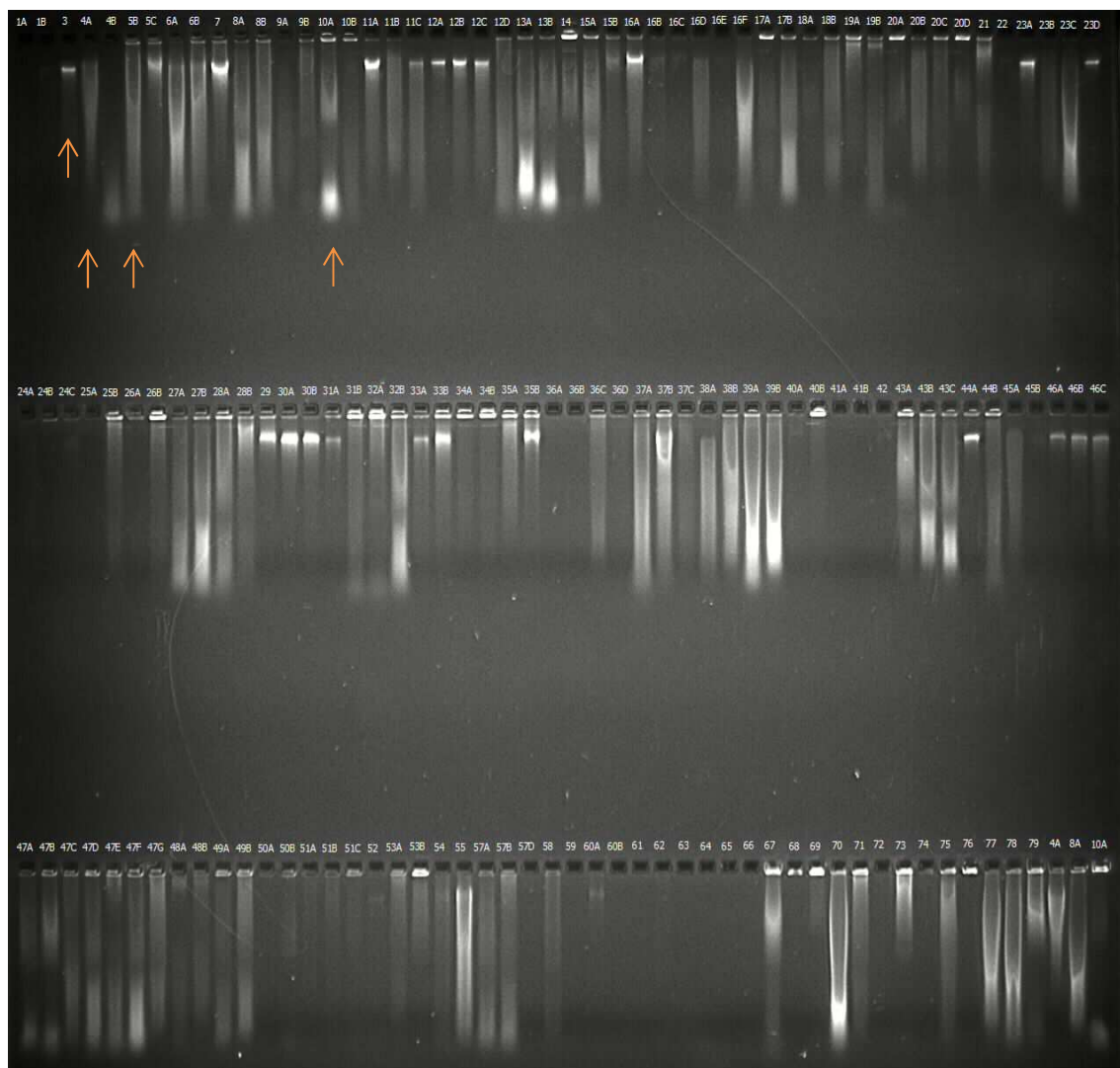
PCR reakce byla úspěšná, ale neproběhla u všech čtyř testovaných vzorků (Obr. 11). Neúspěšná amplifikace u některých vzorků může mít více příčin (viz diskuse).

Tabulka 4: Koncentrace a čistota vyizolované genomické DNA.

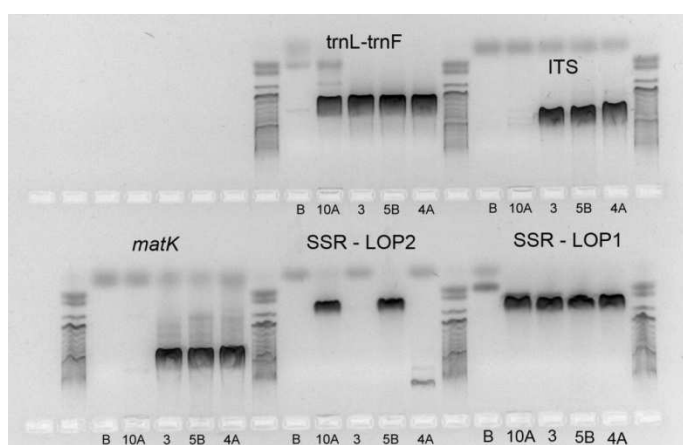
označení vzorku	koncentrace [ng/μl]	260/280	260/230	označení vzorku	koncentrace [ng/μl]	260/280	260/230
1A	34,7	2,67	0,42	28B	164,6	1,84	1,57
1B	17,4	2,32	0,34	29	150,5	2,32	0,59
3	39,4	1,91	1,12	30A	99,9	1,79	0,35
4A	114,9	1,93	1,37	30B	-39,4	1,2	0,3
5B	155	2,04	1,11	31A	82,4	2,26	0,62
5C	78,6	1,96	1,45	31B	81,8	2,01	0,7
6A	130,4	2,16	0,77	32A	91,2	2,29	0,53
6B	186,3	2,09	0,89	32B	91,3	2,29	0,53
7	122,6	1,86	1,37	33A	62,3	2,23	0,49
8A	64,7	1,78	1,3	33B	88,6	2,07	0,82
8B	80,8	1,95	1,33	34A	70,2	1,97	0,69
9A	20,8	2,4	0,87	34B	99,7	1,9	1
9B	16,7	1,69	0,81	35A	28,8	1,48	0,77
10A	105,7	1,87	1,17	35B	101,4	2,1	0,75
10B	43,6	2,43	0,54	36A	25	2,33	0,24
11A	59,8	2,15	0,86	36B	25	2,24	0,26
11B	20,5	1,77	0,7	36C	43,3	1,56	0,6
11C	44,2	2,2	0,56	36D	5	0,71	0,13
12A	37,6	2,02	0,86	37A	114,3	2,45	0,46
12B	37,2	2,03	0,95	37B	145,1	1,86	1,42
12C	50,3	2,05	1	38A	99,1	2,01	1,07
12C	69,7	2,25	0,73	38B	85,9	1,8	1,5
13A	144,8	1,95	1,18	39A	262	1,94	1,57
13B	140,9	1,9	1,32	39B	118	1,67	1,41
14	86,5	1,76	0,96	40A	42,8	2,34	0,42
15A	89,2	1,73	1,09	40B	94	1,9	0,93
15B	79,9	2,22	0,64	41A	34,2	3,01	0,21
17A	60,8	1,85	0,92	41B	3,9	0,93	0,18
17B	136,6	1,9	1,41	41B	4,3	0,74	0,16
20A	84,3	1,99	0,6	42	44,3	1,85	0,86
20B	30	1,69	0,65	43A	77,3	1,75	1,17
20C	36,5	1,78	0,59	43B	75	1,83	1,36
20D	95,5	1,75	1,31	43C	79,5	1,83	1,11
21	111,4	1,79	1,25	45A	31,7	1,45	0,45
22	6,2	-0,55	-0,87	45B	138,2	1,58	0,46
26A	51,5	2,33	0,43	46A	58,8	2,51	0,4
26B	88,1	1,94	1,01	46B	69	2,25	0,53
27A	36,7	1,76	0,76	46C	78,8	2,35	0,5
27B	83,4	1,73	0,89	47B	114	2	1,51
28A	53,4	1,69	1,16	47C	72,7	1,98	1,35

označení vzorku	koncentrace [ng/μl]	260/280	260/230
47D	101,4	1,93	1,28
47E	145,2	2,06	0,88
47F	75,3	1,97	1,11
47G	49,5	1,83	0,81
48A	62,5	2,45	0,39
48B	19,1	1,49	0,41
49B	52	1,77	0,91
49B	55,8	1,65	0,67
50A	33	1,94	0,37
50B	66,5	1,72	0,84
51A	104,6	1,41	0,37
51B	144,3	1,5	0,37
51C	39,4	1,27	0,25
52	52,1	2,23	0,43
53A	79,5	1,41	0,37
53B	24,1	2	0,42
54	51,4	1,95	0,65
55	137	1,83	1,33
57A	44,1	1,68	0,75
57B	68,9	1,8	0,81
57C	43,1	1,61	0,64
57D	51,2	2,4	0,36
58	52,6	1,7	0,94

označení vzorku	koncentrace [ng/μl]	260/280	260/230
59	65,2	2,42	0,45
60A	79,9	1,89	1,09
60B	33,9	1,95	0,36
61	38,4	1,64	0,67
62	25,3	1,68	0,39
63	67	2,28	0,59
64	42,8	2,29	0,41
65	18,7	1,61	0,4
66	32,5	3,36	0,23
67	191	1,78	2,03
68	60,4	2,91	-2,5
69	32,7	7,01	-0,48
70	169,5	2,11	99,25
71	60,1	1,61	0,41
72	-6,9	0,66	0,29
73	247,2	1,6	0,68
74	124	1,44	0,3
75	183	1,83	1,12
76	67,3	1,46	0,4
77	230,9	1,84	2,07
78	211,3	2,27	2,87
79	269,2	1,98	1,01



Obrázek 30: Výsledek agaróзовé elektroforézy vyizolované genomické DNA. Oranžové šipky ukazují na vzorky použité pro testování chloroplastových, jádrových a mikrosatelitových markerů.



Obrázek 41: Výsledek agaróзовé elektroforézy testovaných markerů.

6. Diskuze

I když izolace genomické DNA je v dnešní době spíše rutinní laboratorní záležitostí, ne všechny rostlinné druhy představují jednoduchý materiál pro její izolaci. Zejména sukulentní rostliny např. pryšce, kaktusy, orchideje a mnoho jiných jsou pro vysoký obsah sekundárních metabolitů těžký oříšek pro extrakci kvalitní a nedegradované DNA (Jobes a kol. 1995, Sánchez-Hernández a Gaytán-Oyarzún 2006). To se ukázalo i v průběhu izolace DNA z druhů rodu *Lophophora*. Na výsledném agarózovém gelu jsou patrné 4 typy vyizolované DNA (Obr. 10). Prvním, nejspokojivějším, je DNA, kterou vidíme např. u vzorku 12A, kdy fragmenty DNA tvoří jeden jasný diskretní band/proužek. To znamená, že získaná DNA představuje celistvou DNA, která není fragmentovaná. Druhým typem je hodně fragmentovaná DNA s různou velikostí fragmentů. Nejkratší fragmenty dojdou gelem nejdále a nejdelší fragmenty se zastaví na začátku gelu. Tím vznikají šmouhy DNA (tzv. smears) jako např. u vzorku 5B. Třetím a nejméně vhodným typem je DNA obalená polysacharidy, které způsobují, že DNA je příliš velká a gelem nemigruje, případně migruje v elektrickém poli velice pomalu. DNA „svítí“ pouze v jamkách, což vidíme např. u vzorku 76. Posledním typem výsledku jsou vzorky, u kterých na gelu nepozorujeme přítomnost DNA, avšak koncentrace byla na NanoDropu naměřena, což je případ např. vzorku 60B.

Ne všechny rostlinné materiály jsou vhodné pro extrakci DNA. U rostlin, ze kterých můžeme použít různé orgány (listy, stonky, květ, kořen, atd.) se dají případné potíže obejít použitím pletiva z orgánů, ve kterých se hromadí nejméně metabolitů. U kaktusů je to však nemožné. Izolace DNA z kořenů kaktusů je zcela nevhodná a pro získání dostatečného množství DNA z květních lupenů je zapotřebí velkého množství květů, což je opět málokdy možné. Jediným způsobem, jak obejít těžkosti izolace DNA, je úprava protokolu pro extrakci. Protokol, který jsem používala, byl odzkoušen mým vedoucím práce Dr. Majeským. Protokol byl však testován na čerstvém materiálu, pro který fungoval velice dobře. Rostlinný materiál,

kteřý jsem používala, byl sice zmražen a uchováván při -80°C , ale mezi tím byl několikrát rozmražen a zmražen a v mrazničce byl uchováván více než dva roky. Jelikož čerstvost a způsob uchovávání rostlinného materiálu představuje jeden z nejkritičtějších požadavků při extrakci DNA, je velice pravděpodobné, že stáří a uchovávání se negativně projevilo na výsledné extrakci. Zejména u vzorku s vysoce fragmentovanou DNA. Přítomnost vysokého množství polysacharidů se také negativně projevilo při extrakci DNA. Polysacharidy způsobují hlavně to, že při extrakci se vytváří viskózní směs, která se nedá dobře rozmíchat a pipetovat. Tím pádem v lyzátu stále zůstávají polysacharidy a obalují DNA, čím vzniká směs DNA a polysacharidů, která se velice těžko rozpouští, případně nejde rozpustit vůbec. Nepřítomnost DNA u některých vzorků na agarózovém gelu (Obr. 10) může být způsobena právě chybným pipetováním ne zcela rozpuštěných vzorků, u kterých se v průběhu izolace DNA stávalo, že pelet tvořený z DNA nešel zcela rozpustit, což bylo pravděpodobně způsobeno kontaminací polysacharidy. Nerozpuštění peletu také mohlo zapříčinit naměření záporných hodnot koncentrace DNA i přes to, že na gelu byla DNA pozorována. Naopak, naměřené vysoké koncentrace nukleových kyselin, zejména u vzorků se zřetelně fragmentovanou DNA, mohou být přičítány právě fragmentované DNA, kdy fragmenty zvyšují naměřenou koncentraci. Z toho vyplývá, že koncentrace DNA naměřena pomocí NanoDropu bývá většinou nadhodnocená (což plyne ze samotné podstaty měření koncentrace pomocí světelní absorpance).

Vhodnost vyextrahované DNA pro další molekulárně-genetické analýzy, byla otestována pomocí PCR reakce. Všechny z pěti testovaných úseků amplifikovaly minimálně u dvou ze čtyř zkoušených vzorků (Obr. 11). Z obrázku 10 a 11 je patrné, že pro amplifikaci testovaných markerů je kvalita vyizolované DNA dostatečná. PCR reakce je obvykle dostatečně robustní a mnohdy postačuje velice malé množství DNA pro úspěšnou amplifikaci zvoleného úseku. Neúspěšnost amplifikace u všech vzorků může být také důsledkem

neoptimálního PCR protokolu, případně přítomností inhibitorů (např. právě již zmiňovanými polysacharidy). Optimalizací podmínek PCR reakce a použitých komponentů je možné zvýšit účinnost reakce.

V navazující diplomové práci budu pokračovat v práci na rodu *Lophophora* a zaměřím se na fylogenetickou studii rodu pomocí molekulárních technik. Na studium fylogeneze budou použity testované úseky DNA, které se budou amplifikovat pomocí PCR a následně sekvenovat. DNA vyextrahovaná v rámci mé bakalářské práce se zdá být, alespoň prozatím, vhodná pro její další použití.

7. Závěr

V rámci mé bakalářské práce jsem připravila literární rešerši, ve které jsem zpracovala taxonomickou a nomenklatorickou problematiku rodu *Lophophora*. Literární přehled představuje shrnutí nejaktuálnějších poznatků o rodu *Lophophora*, čerpaných z nejaktuálnějších dostupných literárních zdrojů. V praktické části mé práce jsem použila základní metody molekulární biologie, jako je izolace DNA a agarózová elektroforéza pro izolaci DNA ze 151 rostlinných vzorků. S vyizolovanou DNA budu dále pracovat v průběhu magisterského studia a mé diplomové práce, kdy se zaměřím na biosystematickou studii rodu *Lophophora* a pokusím se o zrekonstruování fylogeneze rodu. Vhodnost vyizolované DNA pro další molekulární analýzy byla ověřena pomocí PCR reakce s použitím pěti různých primerů. I když amplifikace testovaných úseků nebyla úspěšná u všech vzorků, výsledek ukazuje na dostatečnou kvalitu a kvantitu získané DNA. Protokol pro PCR reakci pro jednotlivé primery bude dále optimalizován.

8. Seznam použité literatury:

- Anderson E. F. (1969): The biogeography, ecology and taxonomy of *Lophophora* (Cactaceae). *Brittonia* 21: 299-310.
- Bohata J., Myšák V., Šnicer J. (2005): Genus *Lophophora* Coluter. *Kaktusy* (Špeciál 2): 1–45.
- Bravo H. (1967): Una revisión del género *Lophophora*. *Cactaceas y suculentas Mexicanas* 13:8–17.
- Dunning L.T. a Savolainen V. (2010): Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 1–9.
- El-Seedi H.R., de Smet P.A.G.M., Beck O., Possnert G., Bruhn J.G. (2005): Prehistoric peyote use: Alkaloid analysis and radiocarbon dating of archeological specimens of *Lophophora* from Texas. *Journal of Ethnopharmacy* 101: 238–242.
- Grym R. (2014): *Rod Lophophora*. Společnost' Cactaceae etc., Bratislava, Slovensko.
- Habermann V. (1974): *Lophophora fricii* Habermann spec. nova. *Kaktusy* 74:123–127.
- Jobes V.D., Hurley D.L., Thien L.B. (1995): Plant DNA Isolation: A method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. *Taxon* 44: 379–386.
- Palátová J. (2005): Chválí tě bratr kaktus...*TEOLOGIE&SPOLEČNOST* 4, [http://www.cdk.cz/ts/clanky/96/chvali-te-bratr-kaktus/]
- Palmer J.D. (1987): Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist* 130: 6–29.

- Perrine D. (2001): Visions of the Night: Western medicine meets peyote 1887-1899. *The Heffter Review of Psychedelic Research* 2: 6–52.
- Reko B.P. (1928): Alcaloides y Glucósidos en plantas mexicanas. Memorias y Revista de la Sociedad Científica “Antonio Alzate” 49: 379–420.
- Rowley G.D. (2006): Lophophora - species and cultivars. *British Cactus and Succulent Society* 24:201–209.
- Russell A., Samuel R., Rupp B., Barfuss M.H.J., Šafran M, Besendorfer V. Chase M.W. (2010): Phylogenetics and cytology of pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59: 389 – 404.
- Říha J. (1996): *Lophophora diffusa* var. *koehresii* Říha. *Kaktusy* 96: 70–73.
- Safford W.E. (1915): An Aztec narcotic (*Lophophora williamsii*). Bureau of Plant Industry, United States Department of Agriculture, Washington D.C., 29 –311.
- Sánchez-Hernández C., Gaytán-Oyarzún J.C. (2006): Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharides and secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology* 20: 1864–1867.
- Schultes R. E., Hofmann A., Rätsch Ch. (2001): Plants of the Gods, 2nd edition. Lucerne, Switzerland.
- Schultes R.E. (1938): The appeal of Peyote (*Lophophora williamsii*) as medicine. *American Anthropologist* 40: 698 – 715.
- Stewart O.C. (1987): *Peyote Religion: A history*. Norman: University of Oklahoma Press.

- Šnicer J., Bohata J., Myšák V. (2009): The littlest *Lophophora*. *Cactus and Succulent Journal* 81: 294–300.
- Štarha R., Kuchyna J. (1996): Analysis of Mexican populations of *Lophophora* (Cactaceae). *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universtias Ostraviensis, Physica-Chemia*, 156: 67–70.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Terry M., Steelman K.L., Guilderson T., Dering P., Rowe M.W. (2006): Lower Pecos and Coahuila peyote: New radiocarbon dates. *Journal Of Archaeological Science* 33:1017–1021.
- Terry M.K. (2005): A tale of two cacti: Studies in *Astrophytum asterias* and *Lophophora williamsii*. Ph.D. thesis, Submitted to the Office of Graduate Studies of Texas A&M University.
- Terry, M. (2008): Stalking the wild *Lophophora*, Part 1, Chihuahua and Coahuila. *Cactus and Succulent Journal* 80: 181–186.
- Terry, M. (2008): Stalking the wild *Lophophora*, Part 2, Chihuahua and Coahuila. *Cactus and succulent journal*.
- Thompson Ch. N. (1898): The species of cacti commonly cultivated under the generic name *Anhalonium*. *Annual Report of the Missouri Botanical Garden* 9: 127–135.
- Vaupel F. J. (1911): *Ariocarpus lloydii* Rose spec. nov. *Monatsschrift für Kakteenkunde* 20: 47–48.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J.. Pp. 315-322 Academic Press, New York.

Wikipedia, The Free Encyclopedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Native_American_Church