



## CULTURAL EXTENSION OF *TAXODIUM* IN THE TERRITORY OF SLOVAKIA AND ITS GENETIC-GENOMICAL NOTES

Mňahončáková Erika<sup>1\*</sup>, Ražná Katarína<sup>2</sup>, Hrubík Pavel<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Botanic garden, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia

<sup>2</sup>Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agrobiology and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovakia

<sup>3</sup>Emeritus professor, Dunajská 16, 949 11 Nitra, Slovakia

## KULTÚRNE ROZŠÍRENIE RODU *TAXODIUM* NA ÚZEMÍ SLOVENSKA A JEHO GENETICKO-GENOMICKÉ POZNATKY

Mňahončáková Erika, Ražná Katarína, Hrubík Pavel

Received 25. 6. 2017

Revised 29. 6. 2017

Published 29. 11. 2017

The subject of the research was to find out the cultural expansion of two species of *Taxodium*, namely *Taxodium ascendens* (Brongn.) and *Taxodium distichum* (L.) L. C. Rich. The occurrence of individuals was recorded on 18 different localities of Slovakia, obtaining the taxonomic-dendrometric characteristics of individual trees. Appropriate methodologies and available devices have been used. Biological data, such as tree planting, health status, landscaping value, and tree age were recorded. The *Taxodium distichum* (L.) L. C. Rich. is found in 15 localities in Slovakia and in the three localities of *Taxodium ascendens* (Brongn.). Regarding the number of trees represented, *Taxodium distichum* contains 35 trees growing on individual localities, of which 3 are state-protected trees. We did not confirm 9 trees at registered locations. In general, we have seen a declining level of maintenance and care for our historic parks and state-protected trees. Literary records characterizing the genome of these rare species are focused on the study of genetic variability and polymorphism mapping using various types of molecular markers to elucidate the genetic essence of phenotypic variability and the historical structure of species populations.

**Keywords:** *Taxodium distichum*; *Taxodium ascendens*; taxonomic-dendrometric; characteristics

### Úvod

Druh *Taxodium* je známy svojou významnou toleranciou voči stresu zavodnenia, z čoho vyplýva jeho veľký ekologický a ekonomický potenciál (Qi et al., 2014). *Taxodium*, patrí do čeľade Taxodiaceae – tisovcovité (Mareček et al., 2001). Známe sú tri druhy, ktorých domovom sú južné oblasti Severnej Ameriky a Mexika, väčšinou na bažinách alebo veľmi mokrých pôdach (Hieke, 2008). Uvádzame dva druhy: *Taxodium ascendens* (Brongn.) a *Taxodium distichum* (L.) L. C. Rich., ktoré boli predmetom výskumu a merania na Slovensku.

Tisovec potrebuje v mladosti polotieň, neskôr svetlé stanovište. V našich podmienkach je odolný voči zime, nie je príliš náročný na pôdu, ideálna je teplejšia, piesočnato hlinitá, dobre priepustná a hlavne

\*Corresponding author: Erika Mňahončáková, Botanic garden, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, ✉ [erika.mnahoncakova@gmail.com](mailto:erika.mnahoncakova@gmail.com)

dostatočne vlhká až mokrá pôda. Môže sa pestovať v bažinatom teréne, prípadne i v priechodne plytkých stojatých vodách. Na suchých stanovištiach zakrpatieva, koruny sú preschnuté a riedke. Neznáša zatienenie, znečistené ovzdušie znáša dobre (Hieke, 2008; Mareček et al., 2001).

Napriek výraznému ekologickému a ekonomickému potenciálu, genomické informácie tohto druhu sú limitované, čo značne spomaľuje tvorbu molekulových markérov a ďalšie poznávanie mechanizmov tolerancie daného druhu voči podmienkam zamokrenia (Qi et al., 2014).

## Materiál a metódy

Prieskum na všetkých evidovaných lokalitách sme absolvovali osobnou účasťou autorov publikácie, preto môžeme zodpovedne konštatovať znižujúcu sa úroveň údržby a starostlivosti o naše historické parky a štátom chránené stromy (označenie stromov je však viac rešpektované). Pre zlepšenie súčasného stavu odporúčame rozšíriť zoznam štátom chránených stromov, ako aj niektorých významnejších historických parkov.

Pri našom výskume sme použili osvedčené metodické pracovné postupy a dostupné prístroje a iné pomôcky: výškomer SUUNTO, textilné pásmo s prepočtom cm obvodu kmeňa na jednej strane, na cm priemeru kmeňa na opačnej strane; ďalej sme merali šírku koruny stromu, ako priemet koruny na zem v dvoch smeroch; výška stromu v m; iné biologické údaje: plodenie stromu, zdravotný stav a sadovnícka hodnota; vek stromu – výpočtom podľa matematického vzorca; podľa roku introdukcie dreviny na Slovensko, prípadne do Európy; odhadom podľa celkových rozmerov stromu. Od zisťovania veku pomocou vývrtov z Presslerovho vrtáka, sme pre následnú finančnú náročnosť upustili. Zisťovanie veku stromov považujeme za metodicky najobťažnejšie, preto sa nevyhneme ani využitiu publikovaných údajov o prvej introdukcii dreviny na územie Slovenska.

Základné dendrometrické hodnoty namerané na jednotlivých stromoch vybranej skupiny drevín sú spracované v tabuľkovom prehľade.

## Výsledky a diskusia

Kultúrne rozšírenie dvoch vybraných druhov cudzokrajných drevín, zriedkavo na Slovensku pestovaných, sme zaznamenali na 18 rôznych lokalitách (historické parky, botanické záhrady, arboréta, kategórie ostatnej vegetácie v urbanizovanom prostredí, ako aj pokusné plochy v lesných porastoch). Medzi nimi je aj štátom chránený strom tisovca dvojradového. Medzi najkomplexnejšie publikácie opisujúce rozšírenie uvedených drevín na Slovensku patria práce autorov: Benčať (1982), Holubčík (1968).

Zastúpenie na Slovensku má tisovec dvojradový – 15 lokalít (Tabuľka 1) a tisovec vystúpavý – 3 lokality (Tabuľka 2).

Z hľadiska početnosti zastúpenia evidovaných stromov sa *Taxodium distichum* vyskytuje 35 stromov, rastúcich na jednotlivých lokalitách, z toho 3 štátom chránené stromy. Pritom 9 stromov sme na evidovaných lokalitách nepotvrdili.

Veľkosť genómu tisovca dvojradového je viac ako trojnásobne väčšia v porovnaní s genómom človeka, avšak obsah DNA (1C) patrí medzi jeden z najmenších v rámci ihličnatých druhov (Liu et al., 2011). Veľkosť jeho genómu je 9731 Mb. Je to diploidný druh s počtom chromozómov  $2n = 2x = 22$ . Genomickou analýzou sa zistilo, že 90 % genómu tisovca je tvorené opakujúcimi sa sekvenciami DNA (repetitívna DNA). Väčšina týchto sekvencií je zastúpená nízkymi a strednými počtami kópií v genóme.

**Tabuľka 1** Taxačno-dendrometrické charakteristiky stromov *Taxodium distichum* (L.) L.C. Rich. (pestovanie na Slovensku: 1842 – 2016, maximum 174 rokov)

**Table 1** Taxonomic-dendrometric characteristics of *Taxodium distichum* (L.) L.C. Rich. Trees (cultivated in Slovakia during years 1842–2016, 174 years maximum)

Lokalita	Obvod kmeňa, cm	Priemer kmeňa, cm	Výška stromu, m	Šírka koruny, m	Plodenie (+/-)	Vek
<b>Arborétum Mlyňany SAV</b>	253	80,6	32	12 × 12	+	98
<b>Arborétum Mlyňany P45</b>	232; 234	73,8; 74,6	27	8 × 8		120
<b>Bratislava, BZ PFUK</b>	234	74,6	20	12 × 12	+	94
	156	49,6	22	7 × 7	+	62
	90	28,7	16	5 × 5	+	36
	233; 243	74,3; 77,3	25; 27	10 × 6; 12 × 12	++	97
	208	66,2	24	8 × 6	+	83
	170	54,6	20	10 × 6	+	68
<b>Janova Ves</b>	308	98,4	27	12 × 10	+	122
	300	95,9	18	10 × 10	+	120
	183	58,3	12	10 × 10	+	120
<b>Krupina, CVČ DOMČEK</b>	407	130,0	22	18 × 15	+	162
<b>Malacky, Mestský park</b>	251	80,0	24	17 × 17	+	100
<b>Nitra, BZ SPU</b>	20	6,4	3	1 × 1	-	20
<b>Tomášikovo</b>	445	142,1	32	16 × 16	+	170
	382	122,0	32	14 × 14	+	170
	386	123,3	32	10 × 10	+	170
	425	135,7	32	12 × 12	+	170
	360	115,0	32	12 × 12	+	170
	345	110,2	32	12 × 12	+	170
	306	97,8	30	10 × 10	+	170
	415	132,5	34	14 × 14	+	170
	420	134,1	34	14 × 14	+	170
<b>Topolčianky, Park ŠL</b>	450	143,7	25	17 × 17	+	170
	370	118,3	25	14 × 14	+	148
	274	87,3	27	16 × 16	+	148
	320	102,3	29	15 × 15	+	148
	315	100,7	25	12 × 12	-	148
<b>Tovarníky, Park OcÚ</b>	460	146,9	25	15 × 15	+	170

**Pokračovanie tabuľky 1**  
**Continuation of Table 1**

Lokalita	Obvod kmeňa, cm	Priemer kmeňa, cm	Výška stromu, m	Šírka koruny, m	Plodenie (+/-)	Vek
Trenčianske Teplice	520	165,9	18	14 × 14	+	170
Bernolákovo, hist. park	289	89,7	24	10 × 10	+	145
	243	77,6	24	10 × 10	+	145
	282	90,1	22	8 × 8	+	145
	333	106,4	26	10 × 10	+	145
Rakovice, hist. park SOZŠ	312	99,7	25	11 × 11	+	120
	328	104,8	35	12 × 12	+	120
Želiezovce, Mestský park	394	125,8	23	18 × 17	+	158
	510	162,8	27	18 × 20	+	174

**Tabuľka 2** Taxačno-dendrometrické charakteristiky stromov *Taxodium ascendens* (L.) L.C. Rich.  
**Table 2** Taxonomic-dendrometric characteristics of *Taxodium ascendens* (L.) L.C. Rich. trees.

Lokalita	Obvod kmeňa, cm	Priemer kmeňa, cm	Výška stromu, m	Šírka koruny, m	Plodenie (+/-)	Vek
Bratislava, BZ PFUK	17	5,5	5	2 × 2	-	20
Nitra, BZ SPU	10	3,5	2	1 × 1	-	20
Arborétum Mlyňany P-35	20	6,4	6	3 × 3	-	40

Štúdie prirodzenej genetickej variability umožňujú objasniť genetickú podstatu fenotypovej variability a historickú štruktúru populácie druhu (Ikezaki et al., 2016). Autori sledovali morfológické a ekologické rozdiely medzi *Taxodium distichum* var. *distichum* a *Taxodium distichum* var. *imbricarium* pomocou vysoko výkonnej DNA sekvenácie. Stupeň genetických rozdielov medzi týmito dvomi varietami bol nízky, ale štatisticky významný. Prítomnosť niektorých lokusov poukazovala na aplikáciu pozitívnej selekcie jedincov, čoho dôsledkom je rôzna adaptability druhu na miestne environmentálne podmienky. Z výsledkov vyplýva, že testované jedince *Taxodium distichum* var. *distichum* boli geneticky rozdelené na dve geografické skupiny. Odhadované demografické parametre poukazujú na to, *Taxodium distichum* var. *imbricarium* bol odčlenený od *Taxodium distichum* var. *distichum* počas obdobia miocénu.

Tisovec patrí medzi druhy, ktoré sa vyznačujú vysokou vysokými nárokmi na vlhkosť. Pre účely zalesňovania pobrežných a zamokrených oblastí na juhovýchode Číny, bolo vytvorených viacero vnútro druhových krížencov.

Druhy *Taxodium distichum* a *Taxodium ascendens* boli súčasťou výskumu v rámci reliktných druhov, z hľadiska charakterizácie evolúcie génov MYB, kódujúcich jednu z najväčších skupín transkripčných faktorov, ktoré sa podieľajú na obranných mechanizmoch rastlín (Lu et al., 2014).

Poznatky o genetickej variabilite drevín sú základom pre udržateľný lesný manažment (Popović et al., 2015). Aj napriek významnému ekologickému a ekonomickému potenciálu druhu *Taxodium*, sú

informácie ohľadne genómu týchto druhov nedostatočné, čo má vplyv na ďalší výskum a tvorbu molekulových markérov.

Významnosť a dôležitosť aplikácie molekulových markérov vo výskume drevín potvrdzuje aj práca autorov Tsumura et al. (1999). Dva taxóny druhu tisovca, *Taxodium distichum* var. *distichum* a *Taxodium distichum* var. *imbricarium* boli charakterizované pomocou CAPS markérov (Cleaved Amplified polymorphic Sequence, markéry dĺžkového polymorfizmu reštrikčne štiepenej zmnoženej DNA). Niektorí autori uvádzajú druh tisovec vystúpavý (*Taxodium ascendens* Brongn.) ako odlišný druh, zatiaľ čo iní ho uvádzajú ako varietu/ekotyp (*Taxodium distichum* var. *imbricarium* (Nutt.) Croom). V danej štúdií bola genetická variabilita spomínaných dvoch taxónov analyzovaná použitím 10 DNA markérov na báze sekvencií cDNA z klonov *Cryptomeria japonica*, ako príbuzného druhu tisovca. CAPS kodominantné markéry nenaznačili, že *Taxodium distichum* var. *imbricarium* je odlišný druh od *Taxodium distichum* var. *distichum*. Uvedení autori navrhujú pre tieto dva taxóny označenie ako varietu.

Jedným z najrozšírenejších typov molekulových markérov sú RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, polymorfizmus náhodne zmnoženej DNA). V prípade *Taxodium distichum* L. RICH. bolo na posúdenie genetickej variability 20 jedincov použitých 13 RAPD prajmerov. Na základe získaných hodnôt koeficienta podobnosti bola vytvorená zhluková analýza. Dvadsať jedincov bolo rozdelených do dvoch podzhlukov, poukazujúc na prítomnosť výraznej genetickej variability v rámci daného druhu (Popović et al. 2015). Snahou autorov Lu et al. (2013) bolo vytvorenie takej markérovacej techniky, ktorá by aj napriek nepostačujúcemu množstvu dostupných genomických údajov umožňovala charakterizovať 10 druhov siedmich rodov čeľade Taxodiaceae. Amplifikácia spoločných konzervovaných oblastí kódujúcich sekvencií označovaná ako ACGM (Amplified Consensus Genetic Marker) technika je aplikovateľná pre tvorbu markérov aj pri druhoch s obmedzenou dostupnosťou genomických údajov.

Ďalší typ markérov na báze exprimovaných sekvencií (EST, Expressed Sequence Tag) bol vytvorený na základe dostupných údajov sekvenácie transkriptómu genómu klonu tisovca 'Zhongshansa 406' (Chen et al., 2015). V genóme bolo analyzovaných 108 692 EST sekvencií s celkovou veľkosťou 69,3 Mb, v rámci ktorých sa identifikovalo 10 038 jednoduchých opakujúcich sa poradí nukleotidov (SSR, Simple Sequence Repeats). Priemerný výskyt SSR lokusov v transkriptóme bol jeden na 6,90 kb exprimovaných sekvencií. Najviac zastúpenou skupinou opakujúcich sa sekvencií tvorili jednonukleotidové sekvencie (65,56 %), následne trinukleotidové (22,37 %) a dinukleotidové (10,76 %). Pre vytvorenie SSR markérov boli vybraných 1958 EST-SSR lokusov a následne boli tieto SSR markéry overené návrhom 503 párov prajmerov. Viac ako 50 % z nich umožnilo amplifikáciu požadovaných produktov. Funkčná kategorizácia EST sekvencií potvrdila takmer 53 % homológiu so známymi bielkovinami. Skupina vytvorených EST-SSR markérov poskytuje hodnotný genetický a genomický nástroj pre ďalší genetický výskum druhu *Taxodium*.

Z uvedeného prehľadu je zrejmé, že problematika zaoberajúca sa molekulárnym výskumom týchto vzácných drevín siahla do obdobia ostatných piatich rokov. Práve vďaka súčasným moderným výskumným metódam, ku ktorým patrí aj sekvenácia genómu, a prístrojovej infraštruktúre, bude možné výrazne obohatiť bioinformačné databázy o dôležité informácie pre účely ochrany a manažmentu vzácných genetických zdrojov drevín.

## Závery

Na základe poznatkov z nášho terénneho výskumu kultúrneho rozšírenia vybraných zriedkavo pestovaných cudzokrajných stromov, konštatujeme, že na Slovensku disponujeme vzácnym fytozenofondom cudzokrajných drevín, ktorý je potrebné chrániť, zvelaďovať a propagovať.

## Literatúra

- Benčať, F. 1982. *Atlas rozšírenia cudzokrajných drevín a rajonizácia ich pestovania na Slovensku*. Bratislava: VEDA, vydavateľstvo SAV. 451 s. (mapy), 359 s.
- Hieke, K. 2008. *Encyklopedie jehličnatých stromů a keřů*. Computer Press a.s. 246 s. ISBN 978-80-251-1901-3.
- Holubčík, M. 1968. *Cudzokrajné dreviny v lesnom hospodárstve*. Bratislava : Slovenské vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, 371 s.
- Ikezaki, Y., Suyama, Y., Middleton, B. et al. 2016. Inferences of population structure and demographic history for *Taxodium distichum*, a coniferous tree in North America, based on amplicon sequencing analysis. *American Journal of Botany*, vol. 103, no. 11, p. 1937–1949.
- Lu, Y.-Q., Jia, Q., Tong, Z.-K. 2013. Development of amplified consensus genetic markers in Taxodiaceae based on *Cryptomeria japonica* ESTs data. *Journal of Forestry Research*, vol. 24, no. 3, p. 503–508.
- Lu, Y.-Q., Jia, Q., Tong, Z.-K. 2014. Cloning and sequence analysis of nine novel MYB genes in Taxodiaceae plants. *Journal of Forestry Research*, vol. 25, no. 4, p. 795–804.
- Mareček, F. et al. 2001. *Záhradnícky slovník naučný 5*. Praha : Ústav zemědělských a potravinářských informací. 685 s. ISBN 80-7271-075-3.
- Murray, B.G. 1998. Nuclear DNA Amount in Gymnosperms. *Annals of Botany*, vol. 82, suppl. A, p. 3–15.
- Popović, V., Lučić, A., Ristić, D., Rakonjac, L., Hadrović, S., Drinić Mladenović, S. 2015. analysis of intra-population variability of bald cypress *Taxodium distichum* L. rich.) in seed stand near Backa Palanka using RAPD markers. *Genetika*, vol. 47, no. 2, p. 571–580.
- Tsumura, Y., Tomaru, N., Suyama, Y., Bacchus, S. 1999. Genetic diversity and differentiation of *Taxodium* in the south-eastern United States using cleaved amplified polymorphic sequences. *Heredity*, vol. 83, p. 229–238.
- Qi, B., Yang, Y., Yin, Y., Xu, M., Li, H. 2014. De novo sequencing, assembly, and analysis of the *Taxodium 'Zhongshansa'* roots and shoots transcriptome in response to short-term waterlogging. *BMC Plant Biology*, vol. 14, no. 201. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/201>.