

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE

**VÝVOJ NOVÝCH MIKROSATELITOVÝCH
MARKERŮ PRO SALVIA PRATENSIS
(LAMIACEAE)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Mgr. KAROL KRAK, PhD.

Bakalant: ADÉLA ŠPÍNOVÁ

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bc. Adéla Špínová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Vývoj nových mikrosatelitových markerů pro *Salvia pratensis* (Lamiaceae).

Název anglicky

Development of novel microsatellite markers for *Salvia pratensis* (Lamiaceae)

Cíle práce

Hlavním cílem práce je vývoj nových mikrosatelitových markerů pro populačně genetické a fylogeografické studie druhu suchých trávníků *Salvia pratensis*.

Dílčí cíle:

1. Experimentální testování primerů kandidátních lokusů, vybraných na základě masivního paralelního sekvenování genomu *Salvia pratensis*.
2. Testování variability vybraných markerů na zástupcích 3 populací *S. pratensis*, stanovení základních populačně genetických parametrů.
3. Sestavení multiplexů z nejvariabilnějších markerů a testování jejich využití u příbuzných druhů.

Vyvinuté markery budou v budoucnu využity při studiu postglaciální migrace *S. pratensis*, modelového druhu reprezentujícího vegetaci suchých trávníků.

Metodika

V první části bude zpracována literární rešerše o postglaciální migraci, genetických markerech používaných za tímto účelem a jejich vývoji. V druhé části bude experimentálně testováno a optimalizováno použití kandidátních lokusů.

Doporučený rozsah práce

30 stran

Klíčová slova

mikrosatelity, populační genetiky, post-glaciální migrace

Doporučené zdroje informací

Freeland JR, Petersen SD, Kirk H. 2011. *Molecular Ecology*, 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd. Oxford UK.
Weising K, Wöhrmann T, Huettel B. 2015. The use of high-throughput DNA sequencing for microsatellite discovery in plants. In: Hörandl E, Appelhans MS (eds.) *Next-Generation sequencing in plant systematics*. Koeltz Scientific Books, Königstein.
Zalapa JE., Cuevas H., Zhu H., Steffan S., Senalik D., Zeldin E., McCown B., Harbut R., Simon P. 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*. 99: 193–208

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Mgr. Karol Krak, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Ing. Jan Douda, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 5. 4. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 5. 4. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 12. 04. 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Karola Kraka, PhD., že jsem řádně citovala veškeré použité prameny a literaturu a že práce nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia či k získání jiného nebo stejného titulu. Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s elektronickou verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze dne 25. 4. 2017

.....
Adéla Špínová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Karolovi Krakovi, PhD., za vstřícnost při vedení práce a Martině Hadincové a Lucii Markové za ochotnou pomoc v laboratoři molekulární genetiky.

Abstrakt

Práce je věnovaná vývoji nových mikrosatelitových markerů pro *Salvia pratensis* coby modelový druh středoevropských suchých trávníků a testování jejich variability u zástupců 4 populací. Markery byly vyvíjeny za účelem využití v dalším výzkumu zaměřeném na fylogeografii společenstev suchých trávníků a jejich postglaciální migraci. Experimentální část práce spočívala v izolaci DNA celkem 80 zástupců 4 populací *S. pratensis*, testování 52 kandidátních mikrosatelitových lokusů pomocí PCR a fragmentační analýzy a stanovení základních populačně genetických charakteristik u 5 vyvinutých markerů. Získané mikrosatelitové markery vykazovaly značnou variabilitu a budou dále využitelné v populačně genetických studiích *S. pratensis*.

Klíčová slova

Mikrosatelity, populační genetika, post-glaciální migrace, *Salvia pratensis*.

Abstract

This bachelor thesis deals with the development of novel microsatellite markers for *Salvia pratensis*, a species representing the vegetation of Central European dry grassland, and testing their variability in samples from 4 populations. The markers were developed for the purpose of further research in the field of dry grassland community phylogeography and post-glacial migration. The experimental part of the work consisted of DNA extraction from 80 individuals obtained from 4 populations of *S. pratensis*, testing 52 candidate loci using PCR and fragmentation analysis and assessing basic population genetic parameters from 5 developed markers. The novel microsatellite markers displayed substantial variability and will be suitable for use in population genetic research on *S. pratensis*.

Keywords

Microsatellites, population genetics, post-glacial migration, *Salvia pratensis*.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce.....	9
3. Literární rešerše	10
3.1 <i>Salvia pratensis</i>	10
3.2 Středoevropské suché trávníky	10
3.2.1 Charakteristika	10
3.2.2 Ohrožení a management	12
3.3 Fylogeografie.....	13
3.4 Postglaciální migrace a rekolonizace	14
3.5 Postglaciální historie stepních společenstev ve střední Evropě	15
3.6 Molekulární markery využívané ve fylogeografii.....	17
3.6.1 Typy molekulárních markerů.....	17
3.6.2 Markery založené na restrikční analýze	18
3.6.3 Markery založené na PCR	19
3.7 Mikrosatelity.....	20
3.8 Vývoj nových mikrosatelitových markerů	22
3.9 Mikrosatelitové markery pro <i>Salvia pratensis</i>	25
4. Metodika.....	26
4.1 Materiál	26
4.2 Postup práce.....	26
4.2.1 Izolace DNA	26
4.2.2 PCR.....	26
4.2.3 Analýza PCR produktů.....	27
5. Výsledky.....	28
5.1 PCR a fragmentační analýza.....	28
5.2 Analýza dat.....	30
6. Diskuse	33
7. Závěr	34
8. Seznam použitých zdrojů.....	35
9. Přílohy	38
Příloha A: sekvence testovaných primerů	38
Příloha B: První fáze testování, kontrola produktů PCR na gelu.....	40
Příloha C: Lokusy testované fragmentační analýzou.....	41
Příloha D: Lokusy vybrané pro testování na všech vzorcích DNA	42

1. Úvod

Předkládaná práce vznikla v rámci projektu zaměřeného na studium vývoje holocénní biodiverzity vegetace suchých trávníků v Evropě. *Salvia pratensis* slouží jako jeden z modelových druhů těchto rostlinných společenstev.

Těžiště vlastní práce spočívá v experimentálním testování primerů kandidátních lokusů a testování variability vybraných mikrosatelitových markerů na zástupcích čtyř populací tohoto druhu.

Vývoj nových mikrosatelitových markerů je motivovaný jejich budoucím využitím v populačně genetických a fylogeografických studiích zaměřených na postglaciální migraci druhu *Salvia pratensis* coby zástupce společenstev suchých trávníků.

Práce se v rešeršní části věnuje tématům relevantním pro širší kontext samotného výzkumu, tedy fylogeografii a postglaciální migraci (s důrazem zejména na studium postglaciální migrace evropských stepních druhů), mikrosatelitům a dalším molekulárním markerům, které se ve fylogeografických výzkumech využívají, a *Salvia pratensis* jakožto modelovému druhu vegetace suchých trávníků.

Následuje pak popis metodiky samotného experimentálního výzkumu, shrnutí dosažených výsledků a jejich kritické zhodnocení v diskusi.

2. Cíle práce

Hlavní cíl práce spočívá ve vývoji nových mikrosatelitových markerů pro *Salvia pratensis* coby modelový druh reprezentující vegetaci suchých trávníků. Tyto nově vyvinuté markery budou moci být využity pro fylogeografické a populačně genetické studie.

Dílčí cíle práce jsou potom následující:

1. Experimentální testování primerů kandidátních mikrosatelitových lokusů genomu *Salvia pratensis*;
2. Testování variability vybraných markerů u zástupců čtyř evropských populací *Salvia pratensis* a na základě tohoto testování pak stanovení jejich základních populačně genetických parametrů.

3. Literární rešerše

3.1 *Salvia pratensis*

Salvia pratensis (šalvěj luční) je vytrvalá rostlina dorůstající výšky až jednoho metru a žijící až několik desítek let. Její lodyhy jsou přímé, v době kvetení v horní části větvené, žlaznatě chlupaté, s jedním až třemi páry listů. Vyvinutá je také přízemní listová růžice. Kvete od května do července. Jedna rostlina tvoří obvykle jednu až osm kvetoucích lodyh, ačkoli se vyskytují i jedinci, kteří jich mají dvacet či více. Květenstvím jsou lichopřesleny tvořené třemi až šesti fialovými, zřídka růžovými či bílými květy (Ouborg et Van Treuren 1995, Slavík 2000, Hegland et al. 2001).

Pro rozmnožování musí být dosažena určitá kritická velikost listové růžice. K tomu dochází většinou 4 – 5 let po vyklíčení rostliny. Šalvěj je opylována hmyzem, především čmeláky (rod *Bombus*). Vykazuje poměrně vysokou míru cizosprašnosti – 40 až 80 %, včetně malých populací. Plodem šalvěje je tvrdka. Šíření semen napomáhají žlaznaté trichomy na kalichu, které umožňují uchycení v srsti pasoucích se zvířat. Většina semen klíčí brzy poté, co v srpnu vypadnou, a to jakmile mají dostatek vláhy (Ouborg et Van Treuren 1995, Hegland et al. 2001).

Roste od nížin do podhůří na xerothermních až mezofilních loukách, na mezích a výslunných stráních, u okrajů silnic a železničních náspů na čerstvě vlhkých nebo vysychavých, zásaditých až slabě kyselých hlinitých půdách. Těžištěm výskytu je jižní, východní a střední Evropa. Ojedinelé populace se nacházejí i severněji, v Nizozemí a Velké Británii i ve Skandinávii (Slavík 2000, Hegland et al. 2001).

Katalog biotopů České republiky uvádí šalvěj luční jako diagnostický druh pro biotop T3.4 – Širokolisté suché trávníky. Tento biotop se vyskytuje na mírnějších svazích zpravidla orientovaných k jihu na středně hlubokých až hlubokých půdách, nejčastěji na měkkých sedimentárních horninách křídly, starších i mladších třetihor, na spraších a podsvahových deluviích. Má vyšší primární produktivitu než ostatní typy suchých trávníků, může se proto využívat kromě spásání i jako jednosečné louky (Chytrý et al. 2001).

Dále *Katalog* uvádí výskyt v suchých bylinných lemech (tedy na okrajích lesů a v neobhospodařovaných suchých trávnících), dále také v bazifilních teplomilných doubravách a lesostepních borech.

3.2 Středoevropské suché trávníky

3.2.1 Charakteristika

Středoevropské suché trávníky představují extrazonální obdobu kontinentálních eurasijských stepí. Současné klimatické podmínky střední Evropy odpovídají především lesní vegetaci. Suché trávníky se omezují na teplé, suché svahy na vápnatých půdách (Heise et al. 2015).

Vegetace středoevropských suchých trávníků spadá do třídy *Festuco-Brometea*. Chytrý (2007) pro tuto třídu uvádí následující diagnostické druhy: *Achillea pannonica*, *Artemisia campestris*, *Asperula cynanchica*, *Aster linosyris*, *Astragalus austriacus*, *Avenula pratensis*, *Bothriochloa ischaemum*, *Brachypodium pinnatum*, *Carex humilis*, *Centaurea scabiosa*, *C. stoebe*, *Cirsium acaule*, *Dianthus carthusianorum* s. lat., *Dorycnium pentaphyllum* s. lat., *Eryngium campestre*, *Euphorbia cyparissias*, *Festuca rupicola*, *F. valesiaca*, *Inula ensifolia*, *Koeleria macrantha*, *Medicago falcata*, *Potentilla arenaria*, *Salvia pratensis*, *Sanguisorba minor*, *Scabiosa canescens*, *S. ochroleuca*, *Seseli hippomarathrum*, *S. osseum*, *Stipa capillata*, *Thymus pannonicus*, *T. praecox* a dále konstantní druhy: *Achillea millefolium* agg., *Asperula cynanchica*, *Brachypodium pinnatum*, *Euphorbia cyparissias*, *Festuca rupicola*, *Potentilla arenaria*, *Sanguisorba minor*.

Druhová variabilita suchých trávníků střední Evropy se odvíjí zejména od půdní vlhkosti (obvykle úměrné hloubce půdy), obsahu bazí v půdě a kontinentality klimatu. Ve fytoocenologické literatuře se jednotlivé řády vymezují odlišně podle toho, jestli se za významnější faktor považuje gradient vlhkosti nebo kontinentality. Chytrý (2007) na území České republiky vymezuje při kombinaci fyziognomických, ekologických a fyto geografických kritérií pět hlavních typů suchých trávníků:

1. Trávníky skalnatých svahů (skalní stepi) s relativně vyšším podílem perialpidských a submediteránním druhů.
2. Úzkolisté suché trávníky.
3. Širokolisté suché trávníky představující mezofilnější skupinu suchých trávníků.
4. Acidofilní suché trávníky.
5. Společenstva lesních lemů tvořená teplomilnou bylinnou vegetací.

Do třídy *Festuco-Brometea* spadá vegetace trávníků v teplých oblastech rostoucí na suchých a živinami chudých půdách, která bývá označována také jako xerothermní trávníky nebo stepi. Tyto porosty se složením podobají zonální stepi na Ukrajině a v jižním Rusku, které se rovněž řadí do stejné třídy. Také klimatické podmínky, v nichž se vyskytují středoevropské suché trávníky, do velké míry odpovídají makroklimatu východoevropských stepí, kde nedostatek srážek brání růstu stromů (Chytrý 2007).

V České republice se suché trávníky typicky vyskytují v oblastech, kde průměrná roční teplota přesahuje 7°C a úhrn srážek je nižší než 600 mm/rok. Převážně jde o jižně orientované svahy (pouze v nejteplejších a nejsušších oblastech jsou to svahy různého sklonu a orientace), na nichž dochází k výrazným rozdílům mezi denními a nočními i mezi letními a zimními teplotami a vegetace tu bývá vystavena holomrazům. Půdy na těchto stanovištích bývají mělké, s nízkou schopností zadržovat vodu a malou dostupností živin (Háková et al. 2004, Chytrý 2007).

Tyto podmínky omezují konkurenci náročnějších druhů a umožňují tak přítomnost druhů adaptovaných na nedostatek vody a živin. Rostliny suchých trávníků jsou převážně hemikryptofyty s nízkým podílem nadzemní biomasy, vysokým podílem opěrného a vodivého pletiva a mnohdy s trvalými podzemními orgány (oddenky, cibule). Řada z těchto druhů pak vyžaduje vyšší teploty během vegetačního období, dostatek světla a často také dostatek bazí v půdě (Chytrý 2007).

Vyskytují se také jarní efeméry, které využívají vyšší vlhkost na jaře. Osidlují nejsušší místa, která v létě nezarůstají zapojeným porostem vytrvalých rostlin. Později, v květnu a červnu, dosahuje vrcholu rozvoje vegetativních orgánů většina ostatních druhů. Následně s nastupujícím suchem mohou nadzemní části rostlin usychat, některé druhy pak obnovují vegetativní růst na podzim (Chytrý 2007).

Předpokládá se, že v glaciálním období byly ve středoevropských nížinách a pahorkatinách díky srážkové chudému kontinentálnímu klimatu rozšířené zonální stepi. Po rozšíření lesa v raném holocénu zůstaly stepi omezené na fragmentární plochy, které neumožňovaly zalesnění. U těchto stanovišť lze předpokládat kontinuální existenci stepní vegetace od pozdního glaciálu. Většina současných suchých trávníků na našem území ovšem vznikla druhotně po antropogenním odlesnění (Chytrý 2007, Prajs et al. 2010).

Suché trávníky třídy *Festuco-Brometea* se coby převažující vegetační typ vyskytují v rozlehlé oblasti od jižní Ukrajiny po severní podhůří Altaje. Ve střední Evropě je nejvýznačnější výskyt stepí v panonské oblasti, která zasahuje i na jižní Moravu (tzv. panonské termofytikum). Izolovaně se stepi vyskytují také v severní polovině Čech (tzv. termobohemikum). Podobné izolované lokality kontinentálních stepí se nacházejí také na území Německa a Polska (Chytrý 2007).

3.2.2 Ohrožení a management

Suché trávníky patří v celé Evropě mezi ohrožené biotopy. Ve druhé polovině 20. století docházelo k rozsáhlému zániku zejména sekundárních suchých trávníků závislých na tradičním způsobu obhospodařování (Prajs et al. 2010, Johanidesová et al. 2014). Suché trávníky byly značně fragmentované a degradované v důsledku zalesňování a zemědělského využití půdy. Na řadě míst tyto biotopy existovaly právě díky tradičnímu způsobu obhospodařování, tedy jarní a podzimní pastvě a letní senoseči (Heise et al. 2015, Pokorný et al. 2015).

Směrnice EU o stanovištích (92/43/EHS) řadí suché trávníky třídy *Festuco-Brometea* pod kódem 6210 mezi stanoviště, jejichž ochrana vyžaduje vyhlášení zvláštních oblastí ochrany v rámci soustavy Natura 2000.

Velké části v Evropě dosud zbývajících suchých trávníků se nedostává odpovídající péče a hrozí jim ztráta diverzity v důsledku zhoršení environmentálních podmínek, zániku příhodných stanovišť a jejich značné fragmentace. Některé z evropských suchých trávníků přitom patří mezi druhově nejbohatší rostlinná

společenstva v celosvětovém měřítku (Prajs et al. 2010, Johanidesová et al. 2014). Chytrý et al. (2001) uvádějí pro naše širokolisté suché trávníky následující ohrožující faktory: neobhospodařování pozemků, spad atmosférického dusíku a následný vznik druhově chudých porostů, zarůstání invazními dřevinami a výsadbu borovic.

V České republice stanovují *Zásady péče o nelesní biotopy* pro všechny typy suchých trávníků pravidelný management zejména v podobě odstraňování náletu. Výjimkou je původní bezlesí na nejsušších místech, které nicméně bývá ohroženo eutrofizací a expanzí či invazí nepůvodních druhů (Háková et al. 2004).

3.3 Fylogeografie

Pojem „fylogeografie“ poprvé použili Avise et al. (1987), když navrhovali propojení fylogenetiky a populační genetiky pro výzkum vztahu mezi mikroevolučními a makroevolučními jevy. Avise prosazoval předpoklad, že mikroevoluční procesy fungující vnitrodruhově mohou vysvětlovat rozdíly mezi druhy i vyššími taxony (Avise et al. 1987).

Avise et al. (1987) chápou fylogeografii jako fylogenetickou analýzu geograficky kontextualizovaných genetických dat za účelem testování hypotéz týkajících se vztahů mezi geografickými jevy, distribucí druhů a mechanismy speciace. Doslovně pojem fylogeografie znamená fylogenetickou analýzu organismů v kontextu jejich geografické distribuce (Hickerson et al. 2010).

Fylogeografie tedy propojuje jak časový aspekt (evoluční vztahy), tak aspekt prostorový (geografické distribuce). Zkoumá distribuci genetické variability a faktory, které ji ovlivňují. Tato oblast výzkumu se částečně překrývá s polem krajinné genetiky ve zkoumání distribuce alel v určité geografické oblasti. Fylogeografie ovšem zkoumá historické procesy, které ovlivnily dnešní vzorce genetické variability, zatímco krajinná genetika studuje procesy probíhající v současnosti (Freeland et al. 2011).

Fylogeografické studie jsou prováděny na nejrůznějších taxonomických skupinách. V případě zkoumání jednoho druhu se zabývají otázkami vymezení genetických linií v rámci druhu, identifikace vnitrodruhových hybridizačních zón, introgrese nebo geografických bariér toku genu mezi izolovanými populacemi (Hickerson et al. 2010, Freeland et al. 2011).

Takto lze identifikovat například reakce druhů na klimatické změny, jejich dynamiku a přežívání během pleistocénních klimatických cyklů nebo postglaciální rekolonizační cesty. Fylogeografie tak pomáhá porozumění v oblasti evoluční historie, umožňuje lépe předvídat vývoj při dalších změnách klimatu a pomáhá také v oblasti ochrany biodiverzity (Hickerson et al. 2010).

Fylogeografie se kromě postglaciálního šíření druhů zabývá i nedávnějšími událostmi. V posledních letech se věnuje značná pozornost zejména studiu fylogeografie invazních druhů, které v řadě případů představují vážnou hrozbu pro

biodiverzitu invadovaných oblastí a mohou měnit fungování místních ekosystémů. Invazní druhy jsou také velmi často jednou z příčin vymírání druhů. Fylogeografie dokáže identifikovat původní areál invazního druhu nebo odhalit tzv. kryptické invaze, které nejsou zřetelné z morfologických znaků (Freeland et al. 2011).

Komparativní fylogeografie se věnuje paralelnímu zkoumání více druhů. Porovnáva genetickou strukturu u druhů vyskytujících se ve stejnou dobu na stejných místech. Odhaluje tak druhově specifické procesy od obecnějších, druhově nezávislých reakcí na změny vnějších podmínek (Hickerson et al. 2010).

3.4 Postglaciální migrace a rekolonizace

V mnoha částech světa byly fylogeografické vzorce ovlivněny střídáním dob ledových a meziledových v průběhu pleistocénu. Zejména v pozdním pleistocénu docházelo k rapidním změnám teplot, a to až o 10 – 12°C za 10 let. Největší rozloha zalednění na severní polokouli v posledním glaciálu, tzv. poslední glaciální maximum (LGM – *last glacial maximum*) pak spadá zhruba do doby před 23000 – 18000 lety (Provan et Bennett 2008, Freeland et al 2011).

Během glaciálního-interglaciálního cyklu docházelo k výrazné fluktuaci distribuce druhů. V době, kdy byly rozsáhlé oblasti pevniny pokryty ledem, přežívala řada druhů pouze v glaciálních refugiích v oblastech bez ledového pokryvu (Provan et Bennett 2008, Freeland et al 2011).

Přežívání druhů v izolovaných refugiích a jejich šíření na nově dostupná stanoviště během interglaciálních období mělo zásadní dopad na jejich současné genetické distribuce. V glaciálních refugiích byly populace poměrně malé a mezi těmito izolovanými populacemi vznikaly rozdíly v důsledku genetického driftu a nových mutací. V interglaciálních obdobích pak tyto původně izolované populace často přicházely do vzájemného kontaktu, který umožnil jejich hybridizaci (Freeland et al. 2011, Meindl et al. 2016).

Řada fylogeografických studií se zabývá současnou distribucí genetické diverzity živočichů a rostlin v dříve zaledněných i nezaledněných oblastech (Provan et Bennett 2008). Porovnáním genetické podobnosti populací z dříve zaledněných oblastí a populací v dřívějších refugiích nebo blízko nich můžeme v některých případech zjistit, ze kterých refugií pocházejí populace rozšířené do původně zaledněných oblastí. Díky tomu lze rekonstruovat kolonizační cesty z jednotlivých refugií. Dále je možné identifikovat kontaktní zóny, tedy oblasti, v nichž docházelo k hybridizaci populací rozšířených z různých refugií (Freeland et al. 2011).

V Evropě jsou za tři hlavní glaciální refugia považovány oblasti na Iberském, Apeninském a Balkánském poloostrově. Z nich se potom druhy po ústupu zalednění šířily na nově dostupná stanoviště. Cesty tohoto šíření jsou zkoumány pomocí fosilních a molekulárních dat (Hewitt 2001, Freeland et al. 2011).

Postglaciálnímu šíření druhů v Evropě často bránila vysoká pohoří, jako např. Kantáberské pohoří, Pyreneje, Alpy nebo Karpaty, která všechna představují překážku orientovanou západovýchodním směrem. Zatímco pro některé druhy při

rekolonizaci směřující na sever tato pohoří tvořila bariéry, jiné je úspěšně překonávaly (Hewitt 2001, Freeland et al. 2011, Katjoch et al. 2016).

Rozdílné ekologické vlastnosti druhů, zejména různé způsoby šíření, vedly k tomu, že kolonizačních cest v rámci Evropy bylo více. Ačkoli se u některých dvojic odlišných druhů do velké míry shodují, většina fylogeografických studií ukazuje, že každý jednotlivý druh má vlastní jedinečnou fylogeografickou historii. Rozdíly spočívají mimo jiné v různém počtu genetických linií, různé distribuci linií a proměnlivé úrovni genetické divergence (Freeland et al. 2011).

Důvodů, proč vzorce postglaciálního šíření nevykazují žádnou zásadní shodu, je více. Kromě ekologických rozdílů mezi druhy je to také existence tzv. kryptických refugií, tedy dříve neznámých, menších glaciálních refugií, která odhalují až shody mezi závěry novějších fylogeografických studií (Provan et Bennet 2008, Freeland et al. 2011).

Kryptická glaciální refugia jsou identifikována jako místa s vyšší genetickou variabilitou, která dále v okolí postupně klesá (Freeland et al. 2011). Taková místa byla nalezena v řadě oblastí Evropy a Severní Ameriky, které dříve nebyly považovány za refugia a často se nacházejí severněji než tzv. klasická glaciální refugia (Stewart et Lister 2001, Provan et Bennet 2008).

Důkladnější výzkum kryptických refugií a jejich role v postglaciální rekolonizaci může být důležitý i pro predikci toho, jak budou druhy reagovat na klimatické změny, k nimž dochází v současnosti, včetně jejich schopnosti osidlovat příznivá stanoviště (Provan et Bennet 2008, Freeland et al. 2011).

3.5 Postglaciální historie stepních společenstev ve střední Evropě

Postglaciální historie stepních společenstev ve střední Evropě není doposud plně objasněna. Dosavadní výzkumy ukazují, že stepní druhy vykazují oproti jiným typům vegetace odlišné, pravděpodobně komplexnější fylogeografické vzorce.

Pokorný et al. (2015) předpokládají široké rozšíření stepí ve studených fázích pleistocénu. Dnešní zonální stepi (Rusko, Ukrajina, Kazachstán, Mongolsko, severní Čína) jsou pozůstatky pleistocénní glaciální stepi. Pleistocénní step pokrývala také značné části střední Evropy, kde ji během první poloviny holocénu z většiny vytlačily lesy.

Hensen et al. (2009) uvádí předpoklad, že středoevropské suché trávníky byly značně rozšířené v raném postglaciálním období, kdy před zhruba 10 000 lety došlo k oteplení klimatu. S následným ochlazením a vyšší vlhkostí stepní biotopy ustupovaly opadavým lesům a zůstaly pak omezeny na stanoviště, jejichž edafické nebo klimatické podmínky neumožňují růst stromů.

V průběhu posledních 2 000 let pak v důsledku těžby dřeva a pastvy došlo ke zpětné expanzi stepních fragmentů a v současnosti opět vlivem změn v obhospodařování k jejich ústupu. Populace stepních druhů tedy ve střední Evropě

během holocénu zaznamenaly hned několik vln expanze a ústupu (Hensen et al. 2009, Pokorný et al. 2015).

Magyari et al. (2010) ovšem větší rozšíření stepních trávníků v období před 9 900 až 8 300 lety a jejich následný úbytek neprokázali. Podle jejich zjištění lesostepi přetrvávaly ve Velké dunajské kotlině po celou dobu holocénu, ačkoli docházelo k jistým proměnám druhového složení.

Kajtoch et al. (2016) uvádějí, že většina dosud zkoumaných stepních druhů (jak živočišných, tak rostlinných), které se vyskytují ve střední Evropě, vykazuje podobné fylogeografické rysy – relativně vysokou genetickou podobnost v rámci regionálních skupin populací a střední až vysokou genetickou odlišnost populací z recentně izolovaných oblastí ve studovaném území. To naznačuje přežívání populací i v době maximálního zalednění, a to včetně oblastí položených severně od Českého masivu a Karpat.

Stepní druhy obecně nesdílejí fylogeografické vzorce typických druhů mírného podnebí (v podobě stahování na jih a opětné expanze na sever). Do jisté míry se podobají arktickým a alpickým druhům – sdílí s nimi vzorec interglaciálního stahování a glaciální expanze, tedy opačnou dynamiku distribuce proti druhům mírného podnebí (Kajtoch et al. 2016).

Existence stepních populací v průběhu pleistocénních glaciálů byla spolehlivě potvrzena v Panonské pánvi a Pontické oblasti, tedy v oblastech, které nebyly zaledněny. Distinktivní genetické rysy populací stepních druhů (z rostlin jsou to například *Stipa pulcherrima* nebo *Cirsium panonicum*) severně od Alp, Českého masivu a Karpat v místech, která byla plně zaledněna pouze jednou (před 730 000 – 430 000 lety během tzv. elsterského zalednění), naznačují, že tyto populace se sem rozšířily dříve než v holocénu (Kajtoch et al. 2016).

Hensen et al. (2009) se drží předpokladu, že stepní druhy rostlin migrovaly z východní Evropy západním směrem. Kajtoch et al. (2016) ovšem ukazují, že u stepních druhů lze vyloučit jak typický model severojižního ústupu a expanze, tak hypotézu poměrně nedávné migrace směrem z východu na západ. Geografická struktura genetických charakteristik naznačuje ve střední Evropě složitější historii. Soudí se, že stepní druhy mohly vykazovat širší distribuci v glaciálních obdobích než v interglaciálních (předpokládá se expanze v chladných, nikoli však extrémně mrazivých fázích glaciálů).

Meindl et al. (2016) ve své studii stepního druhu *Scorzonera purpurea* prokázali jak migraci do jižního Německa tzv. dunajskou cestou, tak přežívání druhu v kryptických refugiích ve středním Německu a vznik hybridních zón.

Pokorný et al. (2015) na základě malakologických a palynologických dat potvrdili výskyt stepních biotopů v suchých oblastech severozápadních Čech přetrvávající soustavně během posledních 9 000 let. Podle jejich zjištění step a lesostep na severu Čech přetrvávala až do počátku neolitického zemědělství.

Potvrzují tak teorii, že první zemědělci se mohli usazovat v místech bezlesé stepní krajiny a že nikdy nedošlo k plnému zalesnění našeho území.

Později s rozvojem zemědělství přibývalo bezlesí vytvářející podmínky pro druhy přeživší z pozdního pleistocénu nebo raného holocénu, nicméně obhospodařování (zejména pastva) ovlivnilo podobu těchto sekundárních suchých trávníků (Pokorný et al. 2015).

3.6 Molekulární markery využívané ve fylogeografii

Ke studiu genetické variability se používají tzv. genetické markery. Nejstarší používané genetické markery byly fenotypové, tedy pozorovatelné morfologické znaky organismů. V dnešní době se používají především markery molekulární, založené na analýze proteinů (obvykle enzymů) nebo nukleových kyselin (Avisé 2004).

3.6.1 Typy molekulárních markerů

Klíčové otázky ve fylogeografickém výzkumu jsou kolik genetické variability je přítomno mezi populacemi, jedinci nebo základními genetickými liniemi a jakou mají tyto linie geografickou distribuci. Odhalení fylogeografických vzorců záleží na tom, jakou genetickou strukturu dokáže odhalit zvolený molekulární marker (Gutiérrez-García et Vázquez-Domínguez 2011).

Podle různých kritérií můžeme molekulární markery využívané ve fylogeografii rozdělit na dominantní a kodominantní, organelární a jaderné, repetitivní a nerepetitivní, uni- nebo biparentálně dědičné, neutrální a adaptivní. Tyto vlastnosti jsou podstatné pro výběr vhodných markerů (Freeland et al 2011).

Kodominantní markery umožňují identifikovat všechny alely přítomné na daném lokusu, zatímco dominantní markery odhalí pouze jednu dominantní alelu. Proto jsou kodominantní markery obecně přesnější, dominantní markery lze ovšem často vyvinout snáze (Avisé 2004, Freeland et al 2011).

U diploidních druhů každý kodominantní marker identifikuje jednu alelu v případě homozygotního jedince a dvě alely u heterozygotního jedince. Schopnost rozlišit heterozygoty a homozygoty je jednou z nejdůležitějších vlastností kodominantních markerů, neboť umožňuje snadno vypočítat frekvence jednotlivých alel v populaci (Freeland et al 2011).

Dominantní markery identifikují pro každý lokus pouze jednu alelu a jejich využití neumožňuje rozeznat heterozygoty od homozygotů, proto je potom obtížné vypočítat frekvence jednotlivých alel. Typicky využívají náhodné primery k amplifikaci anonymních úseků DNA, přičemž jeden marker generuje data z několika lokusů naráz. Jejich výhoda spočívá v tom, že není třeba předem znát

žádné sekvence a jejich využití je proto méně náročné a nákladné než u kodominantních markerů (Freeland et al. 2011)

Výhodou organelárních markerů je jednoduchá manipulace. Relativně vysoká rychlost mutace u živočišné mitochondriální (mt) DNA generuje potřebnou variabilitu. U rostlin je rychlost mutace nižší než u jaderné DNA a mtDNA se nevyužívá především kvůli strukturální nestabilitě, která způsobuje potíže při amplifikaci. Chloroplastová DNA má také nižší rychlost mutace než jaderná, ale její nekódující úseky se v rostlinné fylogeografii využívají (Avise 2004).

Organelární genomy také nevykazují žádné (nebo pouze velmi řídké) rekombinace, jejich dědičnost je takřka klonální. Limitující je skutečnost, že organelové markery tvoří jen jediný lokus. Problematická může být i uniparentální dědičnost, která může vést ke zkreslení (např. pokud se pyl a semena rozšiřují různými způsoby). Přesnost genealogie založené na organelární DNA lze testovat pouze hledáním shody s genealogiemi založenými na jaderných markerech (Avise et al. 2004, Freeland et al. 2011).

Jaderné markery jsou dědičné biparentálně, mohou se tedy vyvíjet odlišně od uniparentálně dědičných organelárních markerů. Proto je vhodné kombinovat využití obou typů markerů. Na rozdíl od organelárních markerů také podléhají rekombinaci (Freeland et al. 2011).

Distribuce polymorfních regionů v jaderném genomu není náhodná. Regiony s menším výskytem rekombinací obvykle vykazují také nižší polymorfismus. Kódující úseky DNA jsou méně polymorfní než introny, které jsou tak vhodnější pro populačně genetické studie (Zhang et Hewitt 2003).

Výhodou jaderné DNA u rostlin je její rychlejší vývoj oproti mitochondriální i chloroplastové DNA. Nevýhodou naopak je, že podléhá rekombinaci a selekci (Zhang et Hewitt 2003, Freeland et al. 2011).

Na základě využívaných technologií můžeme molekulární markery rozdělit na ty, které jsou založené na použití restrikčních enzymů štěpících DNA na fragmenty a ty, které jsou založené na amplifikaci úseků DNA pomocí polymerázové řetězové reakce.

3.6.2 Markery založené na restrikční analýze

Restrikční analýza DNA využívá restrikční enzymy – proteiny, rozpoznávající určité specifické motivy v sekvenci DNA (tzv. restrikční místa, obvykle úseky o čtyřech až šesti párech bazí), ve kterých molekulu DNA rozštěpí. Pokud mají dva jedinci restrikční místa různě daleko od sebe, výsledné fragmenty DNA budou mít rozdílnou délku. Zjišťuje se tedy délkový polymorfismus vzniklých fragmentů. Restrikce není cílená na žádný konkrétní známý úsek DNA – pracuje s neznámými, víceméně náhodně generovanými fragmenty (Avise 2004, Freeland et al. 2011).

Na tomto principu fungují markery označované RFLP (*restriction fragment length polymorphism* – polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Restrikční analýza mtDNA u zvířat byla oblíbená do 90. let 20. století, později byla nahrazena přímým sekvenováním mtDNA (Avisé 2004, Breton et al. 2006, Gutiérrez-García et Vázquez-Domínguez 2011).

3.6.3 Markery založené na PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce) byla vyvinuta v 80. letech a znamenala revoluci v molekulární biologii, neboť umožnila zcela nové způsoby získávání genetických markerů. Pomocí PCR lze cíleně amplifikovat ve zkumavce takřka jakýkoli zájmový úsek DNA z takřka jakéhokoli biologického zdroje (Avisé 2004, Freeland et al. 2011).

Princip PCR spočívá v mnohonásobném opakování tří kroků: 1. denaturace dvoušroubovice DNA vysokou teplotou (okolo 95°C), při které se rozpadají vodíkové můstky a dochází k oddělení jednotlivých vláken; 2. nasedání primerů (syntetických oligonukleotidů se specifickou sekvencí bazí) na homologické regiony obklopující úsek DNA, který se má amplifikovat, při teplotě 45 – 65°C; 3. Syntéza komplementárního DNA vlákna od primeru dál pomocí teplotně stabilní polymerázy a dusíkatých bazí (nukleotidů), čímž vzniká nová molekula DNA složená ze dvou vláken (původního a nově syntetizovaného). Nové vlákno je komplementární k tomu, na které nasedl primer. Tento krok probíhá při teplotě kolem 72°C (Avisé 2004, Freeland et al. 2011).

Tyto tři kroky se opakují dvacet- nebo vícekrát a poté následuje prodloužená fáze syntézy a zchlazení vzorků. PCR probíhá v termocyklérech, které jsou nyní standardním vybavením genetických laboratoří. (Avisé 2004).

RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA* – náhodně amplifikovaná polymorfni DNA) je dominantní marker získávaný amplifikací anonymních genomických sekvencí pomocí krátkých primerů (obvykle 10 bp). Sleduje se délkový polymorfismus podle rozdílu mobility amplifikovaných úseků při gelové elektroforéze. Jeden primer u jednoho vzorku často generuje několik fragmentů (Breton et al. 2006). RAPD vykazují poměrně vysoký polymorfismus, výzkum je nicméně špatně reprodukovatelný. Postupně je nahradily kodominantní mikrosatelity, které vykazují vyšší informační hodnotu (Avisé 2004, Breton et al. 2006).

AFLP (*amplified fragment length polymorphism* – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů) je dominantní marker, který kombinuje využití restrikčních enzymů a PCR. Restrikční enzymy rozdělí DNA na úseky, z nichž se amplifikují pouze některé (které mají na jednom konci shodnou sekvenci). Stejně jako u RFLP není amplifikace cílená na specifický známý úsek DNA. Využití AFLP je náročnější, ale také spolehlivější než u RAPD (Avisé 2004, Freeland et al. 2011).

Mikrosatelity jsou kodominantní repetitivní markery získávané amplifikací pomocí specifických primerů, amplifikují tedy pouze jeden konkrétní, předem známý úsek DNA. Vyskytují se v hojném počtu v jaderné i organelární DNA. Jejich výhodou je značný polymorfismus, nevýhodou složitý a nákladný proces vývoje markerů (Breton et al. 2006, Freeland et al. 2011, Mandák 2011). Více o mikrosatelitech v kap. 3.7 níže.

PCR-RFLP je další z markerů, který kombinuje využití PCR a restrikčních enzymů. V tomto případě se nejprve amplifikuje specifický úsek DNA pomocí PCR, který je následně štěpen restrikčním enzymem. U takto vzniklých fragmentů se opět zjišťuje délkový polymorfismus. Stejně jako u RFLP jde o kodominantní marker (Freeland et al. 2011).

SNP (*single nucleotide polymorphism* – polymorfismus jednoho nukleotidu) je marker tvořený variantami na specifickém páru bazí, kde dochází k substituci. Na rozdíl od předchozích markerů u SNP nejde o délkový polymorfismus, zjišťuje se konkrétní nukleotid sekvenováním PCR produktu (v dnešní době lze SNP detekovat i bez předchozí PCR pomocí metod sekvenování nové generace). SNP se vyskytují hojně v takřka všech genomech a představují nejčastější typ genetické variability (u člověka jich je zhruba 1,5 milionu). Jsou kodominantní, ale většinou bialelické – vyskytují se u nich pouze dvě alely na lokus. Potřebnou vyšší variabilitu lze získat kombinací velkého počtu SNP lokusů (Avisé 2004, Freeland et al. 2011).

3.7 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou úseky tandemově se opakující DNA, jejichž repetitivní motiv (tj. nukleotidová sekvence, která se opakuje) je velmi krátký – obvykle 1 – 6 bp (oproti tomu minisatelity tvoří motivy o délce 10 – 60 bp). Mikrosatelity se označují také jako STR (*short tandem repeats*, „krátké tandemové repetice“) nebo SSR (*simple sequence repeats*, „repetice jednoduchých sekvencí“). Vyskytují se v počtech desítek tisíc ve všech eukaryotních genomech a také v řadě dosud prozkoumaných genomů prokaryotních (Avisé 2004, Mandák 2011, Wiesing et al. 2015).

Délka mikrosatelitového lokusu obvykle dosahuje 5 – 40 opakování (Buschiazzo et Gemmell 2006, Mandák 2011). Tato vysoká variabilita počtu opakování motivu vytváří délkový polymorfismus a právě délka alel (a nikoli konkrétní sekvence) je sledovaným znakem (Wiesing et al. 2015). Nejčastější jsou mononukleotidové sekvence, u nichž ovšem pro vysokou nestabilitu během PCR nedokážeme spolehlivě určit délku alel. Používají se proto především dinukleotidy, trinukleotidy a tetranukleotidy; delší sekvence jsou vzácné a zřídka využívané (Mandák 2011).

Podle uspořádání se pak rozlišují mikrosatelity úplné, u nichž opakování sekvencí není přerušeno žádným jiným úsekem, spojené, které tvoří dva mikrosatelity s různou sekvencí nukleotidové repetice jdoucí bezprostředně za sebou,

a přerušované, u nichž je opakování sekvencí přerušeno nerepetitivním úsekem DNA (Mandák 2011).

Důležitou vlastností mikrosatelitů je vysoká rychlost mutace. Buschiazzo a Gemmell (2006) uvádějí, že u eukaryotních organismů dosahuje 10^{-7} až 10^{-3} mutací na lokus a generaci, Hodel et al. (2016) uvádí rychlost 10^{-4} až 10^{-3} mutací na lokus a generaci. Celková rychlost mutace jaderné DNA je přitom zhruba 10^{-10} až 10^{-9} mutací na lokus a generaci (Freeland et al. 2011). Rychlost mutace mikrosatelitů ovšem ovlivňuje řada faktorů. Dlouhé a nepřerušované mikrosatelity mutují rychleji než kratší nebo přerušované, takové lokusy potom vykazují vyšší variabilitu. Rychlost mutace je zároveň vyšší u kratších motivů, přinejmenším pokud se jedná o di-, tri- a tetranukleotidy (Buschiazzo et Gemmell 2006, Freeland et al. 2011).

Spektrum využití mikrosatelitů je velmi široké a neustále se rozvíjí: uplatňují se v mapování genomů, forenzní analýze, určování paternity, stanovení velikosti a struktury populace včetně genetické proměnlivosti a toku genů, tvorbě genetických map, při individuálním genotypování jedinců v populaci atd. Lze je využít také při studiu genetických procesů (např. *selective sweep*, *hitchhiking*) nebo charakteru a dynamiky hybridních zón (Buschiazzo et Gemmell 2006, Mandák 2011, Hodel et al. 2016).

Užitečnost mikrosatelitů v ekologických studiích je daná řadou faktorů. Důležitou vlastností je v tomto ohledu zejména jejich vysoká variabilita daná skutečností, že vysoká mutační rychlost mikrosatelitů generuje v každé populaci značné množství alel. Výskyt více různých alel na jeden lokus znamená, že mikrosatelitový lokus je velmi výhodný z hlediska informační hodnoty na lokus (Mandák 2011, Zalapa et al. 2012). Kromě toho, že jsou mikrosatelity vysoce polymorfní, jsou také velmi početné a poměrně rovnoměrně rozložené po celém genomu (Buschiazzo et Gemmell 2006, Mandák 2011).

Další výhodou je skutečnost, že analýza mikrosatelitů je poměrně jednoduchá (za předpokladu, že známe primery komplementární se sekvencemi obklopujícími daný mikrosatelitový lokus) a zároveň poměrně levná (za předpokladu, že máme potřebné primery) neboť se zjišťuje pouze délkový polymorfismus, nikoli konkrétní sekvence každého jedince. Jakmile jsou k dispozici primery, lze již relativně rychle a snadno zjišťovat délku alel u velkých počtů jedinců. Jednoduchý je také sběr a uchovávání vzorků, které lze skladovat v silikagelu nebo fixačním roztoku. To představuje výhodu například v porovnání s alozymy (Avisé 2004, Freeland et al. 2011, Mandák 2011).

Množství DNA použité při práci s mikrosatelity může být díky využití polymerázové řetězové reakce poměrně malé a DNA také může být do jisté míry degradovaná, neboť se amplifikují pouze její krátké úseky. Při kontaminaci vzorku nepřibuznou DNA (např. houbovými vlákny) navíc nehrozí amplifikace DNA nepřibuzného druhu, protože mikrosatelity jsou vysoce druhově specifické (Mandák 2011, Hodel et al. 2016).

Mikrosatelity mají ovšem i jisté nevýhody. Kvůli již zmiňovanému faktu, že jsou druhově specifické, je mezidruhový přenos markerů často neúspěšný a přenesených markerů je pak příliš malý počet. Proto je nutné pro každý zkoumaný druh vyvinout nový set mikrosatelitů (Mandák 2011, Wiesing et al. 2015). Detekování mikrosatelitových markerů je náročné a nákladné, ačkoli situace se v posledních letech zlepšila díky sekvenování nové generace. Primery je dále nutné testovat, protože aby byly využitelné ve výzkumu, musí být specifické (musí amplifikovat pouze jeden lokus) a musí vykazovat jasný polymorfismus (Zalapa et al. 2012). Existuje sice možnost zadat vývoj mikrosatelitových markerů komerční firmě, tento postup je ovšem značně nákladný (Mandák 2011, Wiesing et al. 2015).

Další nevýhody mikrosatelitů představují nejasný mutační mechanismus, výskyt homoplázie (tedy alel o stejné délce, ale nestejného původu), která může maskovat skutečnou alelickou bohatost populace, a výskyt nulových alel. Ten je způsobený mutací v místě nasedání primeru, v jejímž důsledku při PCR nedojde k amplifikaci. Pokud se mutace vyskytne u jedné alely, jedinec se jeví jako homozygot, pokud u obou, amplifikace nepřináší výsledek žádný (Avisé 2004, Mandák 2011, Wiesing et al. 2015).

Vysoká mutační rychlost a nízký počet zkoumaných lokusů pak vedou k tomu, že markery nepokrývají reprezentativně celý genom. Kromě toho neznáme jejich rozmístění v genomu a tím pádem ani celkovou genomickou diverzitu (neboť distribuce polymorfismu v genomu není rovnoměrná ani náhodná), což představuje problém zejména při zkoumání druhu na úrovni širšího areálu nebo porovnávání blízce příbuzných druhů. Pro studium vztahů mezi druhy je proto vhodnější použít markery, které lépe reprezentují genomickou diverzitu, například AFLP (Zhang et Hewitt 2003, Mandák 2011, Wiesing et al. 2015).

3.8 Vývoj nových mikrosatelitových markerů

Vývoj funkčního setu mikrosatelitových markerů je poměrně náročný proces. Zalapa et al. (2012) i Wiesing et al. (2015) uvádějí podobná schémata postupu, jejichž základem jsou následující čtyři kroky:

1. příprava genomové knihovny
2. sekvenování na vybrané platformě
3. identifikace mikrosatelitů, výběr kandidátních lokusů a design primerů
4. testování a validace vybraných markerů

Detekování mikrosatelitových lokusů v posledních desetiletích značně zefektivnily technologie tzv. sekvenování nové generace. Pojmem „sekvenování nové generace“ (NGS, *next-generation sequencing*) se označují nové, vysoce efektivní metody sekvenování, které poskytují tisíce až miliony sekvencí naráz při zlomku nákladů

tradičních Sangerovských metod (Mandák 2011, Zalapa et al. 2012, Hodel et al. 2016).

Prvním krokem při využití NGS je výběr templátové nukleové kyseliny a její příprava do podoby, ve které je kompatibilní s použitým systémem sekvenování. Při přípravě knihovny pro NGS je nutné zvážit několik aspektů (Wiesing et al. 2015).

První otázkou je, zda využít DNA nebo RNA. Sekvenování transkriptomu je experimentálně náročnější než sekvenování genomické DNA, neboť vyžaduje izolaci mRNA, její zpětný přepis do cDNA a přípravu cDNA knihovny. Výsledkem je potom rozsáhlý soubor EST (*expressed sequence tag* – krátká subsekvence cDNA). Tento postup získal na oblibě s rozvojem NGS, díky kterému je nyní výrazně časově efektivnější než dřív (Wiesing et al. 2015).

Využití transkriptomických dat pro získávání mikrosatelitových markerů má oproti práci s genomickou DNA několik výhod. Transkribované úseky DNA jsou méně repetitivní, což je obzvláště výhodné u druhů s rozsáhlým genomem a tedy velkou mírou repetitivní DNA. Transkriptomové markery jsou také obecně lépe přenositelné mezi druhy (Wiesing et al. 2015).

Mikrosatelitové EST markery jsou propojené s kódujícími úseky DNA. Nejsou to tedy neutrální markery využitelné při identifikaci částí genomu podléhajících selekci. Tato skutečnost ale může zároveň být nevýhodou pro některé typy aplikací, například v populační genetice, kde mohou kvůli non-neutrálnímu vývoji ukazovat zkreslené hodnoty distribuce alel mezi populacemi. Navíc propojení s kódujícími sekvencemi může někdy omezovat polymorfismus EST markerů, což vede k nižšímu počtu alel na lokus a/nebo menší pozorované heterozygotitě (Wiesing et al. 2015).

Další otázkou při přípravě knihovny je, zda ji cíleně obohacovat o mikrosatelity. NGS u genomické DNA poskytuje až několik milionů sekvencí, které se potom využívají k vyhledávání mikrosatelitů. Obvykle lze detekovat několik stovek až tisíců mikrosatelitových lokusů, což je dostatek pro vývoj markerů pro takřka jakýkoli typ studie. Obohacování nicméně může zvýšit počet detekovaných markerů u druhů, které mají nižší míru výskytu mikrosatelitů v genomu (obvykle jsou to druhy s větším genomem). Navíc dokáže eliminovat motivy, které se vyskytují často, ale obtížně amplifikují (Wiesing et al. 2015).

Obohacování na druhou stranu vytváří systematické zkreslení výsledků, protože upřednostňuje určité typy mikrosatelitů, zatímco výsledky náhodného sekvenování proporcčně odpovídají jejich distribuci v celém genomu. Obohacování navíc zvyšuje časovou a finanční nákladnost přípravy knihoven (Wiesing et al. 2015). V dnešní době se proto obohacování ve většině případů nepoužívá (Zalapa et al. 2012).

Důležité rozhodnutí se týká výběru NGS platformy. V současnosti je k dispozici několik různých typů sekvenování nové generace, u nichž zásadní rozdíly spočívají především v délce výsledných sekvencí, jejich chybovosti, rychlosti

procesu a jeho finanční nákladnosti (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015, Hodel et al. 2016).

Do poměrně nedávné doby byla velmi oblíbená platforma 454, založená na metodě pyrosekvenování fragmentů připravených pomocí emulzní PCR na kuličkách. Tato technologie poskytuje relativně dlouhé úseky, což představuje výhodu pro design primerů. Výstupní data jsou také relativně snadno zpracovatelná (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015). Nevýhoda je v porovnání s ostatními platformami výrazně vyšší cena za srovnatelný objem dat, kvůli které technologie 454 postupně ztratila konkurenceschopnost a nyní už se nepoužívá (Hodel et al. 2016).

Platforma Illumina je v současnosti nejpoužívanější. Dříve měla značnou nevýhodu v krátkosti osekvenovaných úseků, postupně se ovšem jejich délka zvětšovala. Illumina má také velmi nízkou chybovost (Hodel et al. 2016). Tato technologie je založená na metodě můstkové PCR a sekvenování syntézou pomocí sekvenačních primerů (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015).

Jedna z nejnovějších NGS technologií je IonTorrent. Je dostupná od roku 2010 a zakládá se na pyrosekvenování za pomoci polovodičových čipů. Na základě změny pH se potom detekují uvolněné protony (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015).

Nejnovější je potom platforma PacBio, která bývá označována za sekvenování 3. generace. Pomocí této technologie dochází k sekvenování jediné molekuly DNA v reálném čase (není nutné amplifikovat úseky DNA pomocí PCR, tato metoda je tedy nejrychlejší). Označuje se také jako SMRT (*single-molecule real-time*) sekvenování. Nevýhodou je větší chybovost, kterou ovšem lze snížit na přijatelnou úroveň mnohonásobným sekvenováním jedné molekuly. Navíc se eliminují chyby, které by mohly vzniknout při PCR. PacBio také generuje mnohem delší úseky než ostatní NGS metody, což je pro vývoj mikrosatelitů značná výhoda (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015, Hodel et al. 2016).

Data získaná sekvenováním jsou dále zpracovávána softwarem, který vyhledá mikrosatelitové sekvence. Podle potřeby je možné nastavit limit opakování motivu (obvykle 5 opakování), méně násobné repetice se vyřadí. U mikrosatelitů s dostatečně dlouhými úseky obklopujícími lokus se vyberou ty, které jsou vhodné pro design primerů (neměly by např. obsahovat tandemové repetice). Délka výsledných produktů PCR se pak pohybuje mezi 100 a 500 bp (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015).

Vzhledem k vysokému počtu detekovaných lokusů při využití NGS lze na výběr mikrosatelitů k testování aplikovat poměrně přísná či specifická kritéria. Obvykle se vyřazují všechny mononukleotidové repetice. Preferují se úplné repetice před přerušovanými nebo spojenými, protože u nich dochází k mutacím podle jednoduššího modelu. Větší počet opakování obvykle znamená větší variabilitu markeru (více různých alel, větší heterozygotitu), lze tedy nastavit limit minimálního

počtu opakování motivu např. od 7 opakování pro dinukleotidy po 4 pro penta a hexanukleotidy (Zalapa et al. 2012, Wiesing et al. 2015).

Dalším krokem je potom testování vybraných markerů. Zatímco detekce stovek nebo i tisíců mikrosatelitových lokusů z jednoho genomu je díky NGS rychlá a relativně snadná, tvorba funkčních markerů a jejich validace zůstává časově náročnou a nákladnou fází výzkumu (Wiesing et al. 2015, Hodel et al. 2016).

Úspěšnost vývoje mikrosatelitových markerů se u různých druhů liší. Je třeba testovat velké množství kandidátních markerů na dostatečném souboru vzorků DNA. Klíčový je přitom předchozí krok – pečlivý výběr kandidátních lokusů. Ten může ušetřit čas a náklady na získání funkčních markerů (Wiesing et al. 2015).

U vybraných mikrosatelitových markerů se nejprve testují primery na menším datasetu. Zjišťuje se, zda amplifikují a zda tvoří specifické produkty. Dále se na větším datasetu složeném ze zástupců více populací (prostorově od sebe vzdálených) testuje polymorfismus markerů. Další možností je testovat také přenos vyvinutých markerů na příbuzné druhy, tedy cross-amplifikaci (Wiesing et al. 2015).

3.9 Mikrosatelitové markery pro *Salvia pratensis*

Pro druh *Salvia pratensis* neexistuje zatím dostatečný set mikrosatelitových markerů pro fylogeografický výzkum. Radosavljević et al. (2011) testovali 11 známých a 9 nově vyvinutých markerů pro *Salvia officinalis* a pět z nich bylo úspěšně přeneseno na *S. pratensis*, nicméně tento počet je pro populačně genetické studie příliš nízký. Nejsou navíc známy ani základní populačně genetické parametry těchto markerů u *Salvia pratensis*. Je proto nutné za tímto účelem otestovat nové mikrosatelitové markery.

4. Metodika

4.1 Materiál

Použité vzorky druhu *Salvia pratensis* pocházejí ze čtyř populací v České republice, Polsku a Maďarsku (viz tabulku).

Populace	Lokalita	zem. šířka	zem. délka
1	České středohoří, Oblík	50.4102239	13.8070417
2	Maďarsko, Dorog, Strázsa-hegy	47.750617	18.741983
3	Polsko, Raclawice, Waly	50.338267	20.233317
4	Polsko, Zuravce	50.374650	23.577533

Tabulka 1: Lokality sběru vzorků.

Z každé populace byly odebrány vzorky listů dvaceti různých jedinců. Vzorky byly uloženy do silikagelu a uchovávány v laboratoři molekulární genetiky FŽP ČZU v Praze.

4.2 Postup práce

4.2.1 Izolace DNA

Před izolací DNA byl suchý materiál po 90 sekund drcen pomocí oscilačního mlýnku MM 400 (Retsch) za použití 3 skleněných kuliček na zkumavku při frekvenci 30 Hz. K samotné izolaci byl potom využíván DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) podle instrukcí výrobce. Z každého vzorku byly získány dvě eluce po 50 μ l.

U extrahované DNA bylo provedeno měření koncentrace pomocí mikroobjemového spektrofotometru UVS 99 (Avans Biotech) a kontrola kvality elektroforézou na 1% agarózovém gelu.

4.2.2 PCR

Dalším krokem byla polymerázová řetězová reakce (PCR) určená k otestování amplifikace mikrosatelitů při použití 52 párů primerů dodaných firmou Sigma-Aldrich (z těchto 52 mikrosatelitových lokusů vybraných na základě masivního paralelního sekvenování genomu druhu *Salvia pratensis* bylo 10 tetranukleotidů, 23 trinukleotidů a 19 dinukleotidů; pro sekvence jednotlivých primerů viz přílohu A). Jako základ reakční směsi byl využit 1x koncentrovaný Multiplex PCR Master Mix (Quiagen). Reakční směs o objemu 10 μ l obsahovala vždy 0,2 μ M obou primerů a 20 ng DNA. PCR program byl následující: 95°C po 10 minut; dále ve 35 cyklech 95°C po 30 sekund, 55°C po 30 sekund a 72°C po 2 minuty; nakonec 72°C po dobu 10 minut a zchlazení na 4°C.

V první fázi byl každý pár primerů testován na dvou vzorcích DNA spolu s negativní kontrolou (reakce, do které byla místo DNA pipetována voda) a produkty PCR byly zkontrolovány elektroforézou na 2% agarózovém gelu.

Primery, které v první fázi tvořily specifické produkty a amplifikovaly alespoň u jednoho ze dvou vzorků DNA, byly následně testovány na 7 vzorcích DNA, které reprezentovaly všechny čtyři lokality sběru. V této fázi byly do reakční směsi přidávány univerzální fluorescenčně značené M13 primery (6-FAM, VIC, NED, PET), které umožňují pro účely kapilární elektroforézy smíchat vždy čtyři různě značené vzorky. Značený univerzální M13 primer při PCR nasedá na komplementární sekvenci produktu vytvořeného pomocí specifického forward primeru (tzv. M13-tailed), který byl upraven přidáním sekvence M13 primeru na svém 5' konci (tzv. M13-tailed forward primer). Pro tento účel se v pozdějších cyklech PCR snižuje teplota pro nasedání primerů (Schuelke 2000).

Reakční směs o objemu 10 µl tedy obsahovala 0,05 µM forward primeru, po 0,2 µM reverse a univerzálního M13 primeru a 20 ng DNA. PCR program byl upraven na: 95°C po 15 minut; dále ve 25 cyklech 95°C po 30 sekund, 55°C po 30 sekund a 72°C po 2 minuty; v další fázi 10 cyklů 95°C po 30 sekund, 50°C po 30 sekund a 72°C po 2 minuty; nakonec 72°C po dobu 10 minut a zchlazení na 4°C.

4.2.3 Analýza PCR produktů

PCR produkty ze 4 PCR reakcí s různě značenými M13 primery byly smíchány a následně analyzovány na kapilárním DNA analyzátoru ABI 3500 (Applied Biosystems) s využitím interního standardu GeneTrace 500 LIZ (Carolina Biosystems). Vzorky byly na fragmentační analýzu připraveny smícháním 12 µl deionizovaného formamidu (Applied Biosystems), 0,2 µl velikostního standardu a 1 µl směsi PCR produktů a následně denaturovány po 10 minut při teplotě 95°C.

Poté byly zobrazeny v programu GeneMarker 2.6.4 (SoftGenetics) a bylo zjišťováno, zda proběhla amplifikace lokusů, nakolik je čitelný jejich tvar, kolik alel amplifikovalo (více než 2 alely u diploidního organismu signalizují nespecifický produkt amplifikace) a jaká je jejich přibližná variabilita a délka. Lokusy, které vykazovaly požadované vlastnosti (amplifikace u vzorků ze všech lokalit, specifický produkt, minimální variabilita 3 různé alely) byly amplifikovány u všech vzorků DNA s využitím značených M13 primerů (PCR program viz poslední odstavec předchozí kapitoly).

Získané PCR produkty byly opět analyzovány na DNA analyzátoru a po vyřazení 2 lokusů, u kterých se na větším datasetu objevily nespecifické produkty (3 až 5 píků u zástupců z více lokalit) byly v programu GeneMarker zjištěny délky alel. Následně byla v programu Cervus 3.0.7 (Field Genetics) provedena genetická analýza získaných dat, a to jak pro soubor všech vzorků, tak pro jednotlivé populace. Byl zjišťován počet alel na lokus, rozpětí jejich délky, pozorovaná a očekávaná heterozygita a polymorfní informační obsah.

5. Výsledky

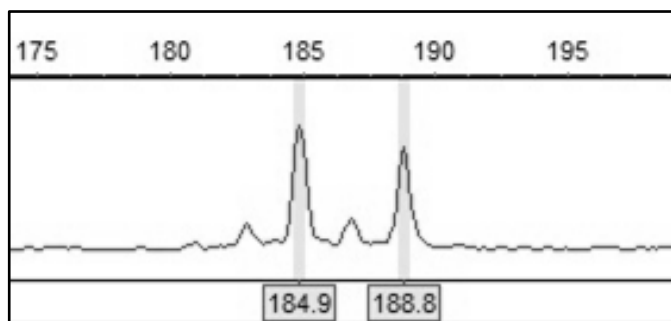
5.1 PCR a fragmentační analýza

V první fázi testování primerů bylo po kontrole PCR produktů na gelu vyřazeno 17 párů primerů (z původních 52), které nedávaly žádný výsledek nebo u nich byl produkt nespecifický (viz přílohu B). U zbylých 35 došlo k amplifikaci u alespoň jednoho ze vzorků. Tyto lokusy byly podrobeny dalšímu testování.

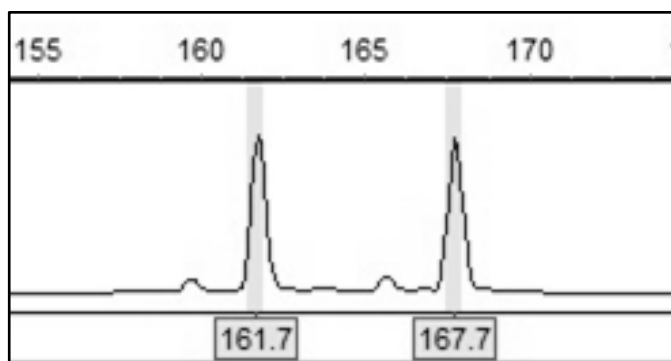
Po první fragmentační analýze byly následně vyřazeny 3 lokusy, které se ukázaly jako duplicitní (více než dva píky na jeden vzorek DNA – tři, čtyři, resp. až devět píků), a 25 lokusů, u nichž k amplifikaci buď nedošlo, nebo neproběhla u žádného jedince z jedné či více lokalit (viz přílohu C). Zbylých 7 amplifikovalo u všech lokalit (viz přílohu D), ty byly dále testovány se všemi vzorky DNA.

Druhá fragmentační analýza odhalila u 2 lokusů duplikaci, která se v předchozí fázi na malém počtu vzorků neprojevila. Tyto lokusy byly z dalších analýz vyloučeny, neboť vzorků s více než 2 píky bylo 13 (SP Di 01), resp. 21 (SP Di 09) z celkového počtu 77 vzorků a vyskytovaly se ve všech populacích.

U zbylých 5 markerů bylo v programu GeneMarker 2.6.4 provedeno automatické skórování alel s následnou kontrolou a manuální úpravou výsledků. Lokusy SP Di 02 a SP Di 08 byly velmi dobře čitelné, s typickým tvarem mikrosatelitových píků včetně poměrně nízkých stutterů (viz obr. 1 a 2).

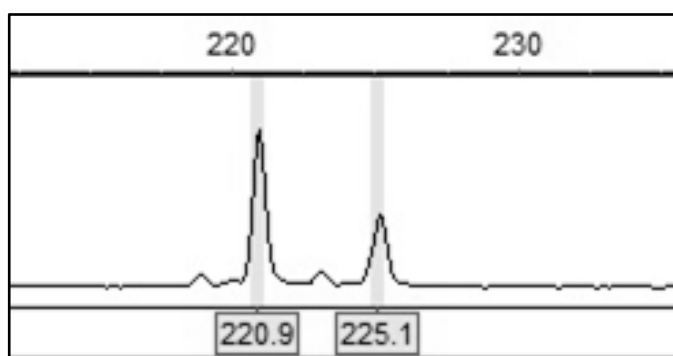


Obr. 1: Lokus SP Di 02, heterozygot. (GeneMarker)

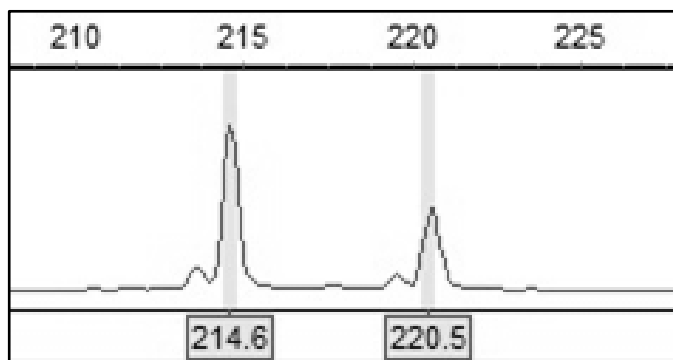


Obr. 2: Lokus SP Di 08, heterozygot. (GeneMarker)

U lokusů SP Di 06 a SP Tri 17 byl opět velmi dobře čitelný, typický tvar píků s nízkými stuttery. V případě heterozygotních jedinců ovšem delší alela měla výrazně nižší pík, a to i v případech, kdy mezi alelami byl délkový rozdíl pouze několika bp (viz obr. 3 a 4). V případě výraznějšího délkového rozdílu mezi oběma alelami často software delší alely s hůře rozeznatelnými píky nenaskóroval (projevila se tendence k jevu zvanému *large allele drop-out*, tedy menší efektivita PCR při amplifikaci delších úseků ve srovnání s kratšími) a bylo nutné je označit manuálně. I tyto nízké píky ovšem měly dostatečně čitelnou podobu a zřetelný stutter, lze tedy předpokládat jejich úspěšné odhalení.



Obr. 3: Lokus SP Di 06, heterozygot. (GeneMarker)

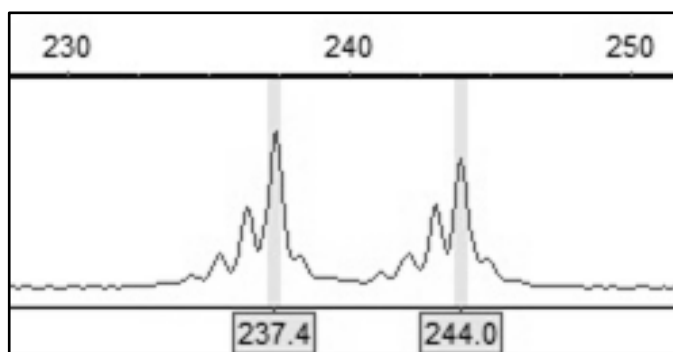


Obr. 4: Lokus SP Tri 17, heterozygot. (GeneMarker)

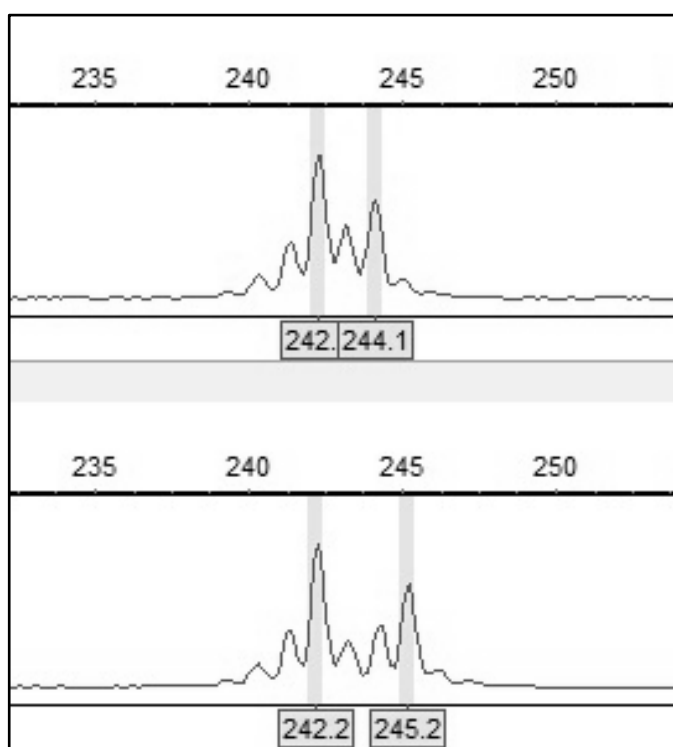
Největší chybovost automatického skórování se objevila u lokusu SP Di 04. Tento lokus vykazoval nestandardní tvar se čtyřmi až šesti píky na jednu alelu. Samotné alele předcházelo několik postupně se zvyšujících stutterů (obvykle tři nebo čtyři) a v řadě případů za ní následoval ještě nízký pík tzv. +A alely (viz obr. 5), která vzniká nadbytečným přidáním adenosinu v průběhu PCR.

V tomto případě bylo nutné manuálně opravit téměř všechny vzorky, neboť software obvykle označoval vícero píků. Skórování vyžadovalo velmi pečlivou pozornost především kvůli tomu, že u heterozygotních jedinců s malým délkovým rozdílem mezi alelami se píky obou alel a jejich stutterů vzájemně částečně

překrývaly (viz obr. 6). Nestandardní tvar byl ovšem značně konzistentní a umožňoval rozpoznání i v případě takovýchto překrývajících se alel.



Obr. 5: Lokus SP Di 04, heterozygot. (GeneMarker)



Obr. 6: Lokus SP Di 04, překrývající se píky. (GeneMarker)

5.2 Analýza dat

Všech pět lokusů vykazovalo vysokou variabilitu. Počet alel se pohyboval mezi 9 (SP Di 06) a 22 (SP Di 08), přičemž v průměru na jeden lokus připadalo 17,2 alely. Pozorovaná heterozygosita (H_o) dosahovala hodnot 0,548 (SP Di 06) až 0,840 (SP Di 08) a průměru 0,696. Vypočítané hodnoty očekávané heterozygosity (H_e) se pohybovaly mezi 0,706 (SP Di 06) a 0,867 (SP Di 08) s průměrem 0,8157. Hodnoty pozorované heterozygosity byly ve všech případech mírně nižší než očekávané.

Polymorfni informační obsah (PIC – *polymorphism information content*) dosahoval hodnot od 0,661 (SP Di 06) do 0,848 (SP Di 08) a průměru 0,7895 (viz tab. 2).

Všechny vzorky						
lokus	počet jedinců	počet alel	délka alel	H _o	H _e	PIC
SP Di 02	74	18	163–216	0,689	0,808	0,781
SP Di 04	67	17	224–254	0,672	0,838	0,818
SP Di 06	73	9	219–234	0,548	0,706	0,661
SP Di 08	75	22	159–203	0,840	0,867	0,848
SP Tri 17	74	20	203–262	0,730	0,859	0,839
průměr		17,2		0,696	0,8157	0,7895

Tabulka 2: Genetická analýza dat – soubor všech populací.

Z výše uvedených hodnot vyplývá, že obecně nejvyšší míru polymorfismu podle všech měřítek vykazoval lokus SP Di 08 a nejnižší lokus SP Di 06. Víceméně tomu odpovídaly i hodnoty jednotlivých populací (viz tab. 3 až 6), ačkoli mezi nimi byly patrné jisté rozdíly. U populace 4 jsou výrazně nižší hodnoty heterozygosity i PIC než u ostatních populací u lokusu SP Tri 17, který by se jinak polymorfismem vyrovnal lokusu SP Di 08.

Populace 1						
lokus	počet jedinců	počet alel	délka alel	H _o	H _e	PIC
SP Di 02	16	8	163–207	0,563	0,565	0,527
SP Di 04	16	9	224–250	0,625	0,794	0,735
SP Di 06	16	4	219–225	0,250	0,567	0,500
SP Di 08	18	11	162–208	0,778	0,829	0,783
SP Tri 17	17	11	213–262	0,765	0,827	0,786
průměr		8,6		0,596	0,7162	0,666

Tabulka 3: Genetická analýza dat – populace 1.

Populace 2						
lokus	počet jedinců	počet alel	délka alel	H _o	H _e	PIC
SP Di 02	19	8	177–209	0,684	0,789	0,737
SP Di 04	17	11	235–254	0,588	0,784	0,743
SP Di 06	19	5	221–234	0,526	0,653	0,598
SP Di 08	17	10	162–196	0,765	0,783	0,740
SP Tri 17	17	9	209–259	0,824	0,854	0,807
průměr		8,6		0,677	0,7726	0,7248

Tabulka 4: Genetická analýza dat – populace 2.

Populace 3						
lokus	počet jedinců	počet alel	délka alel	H _o	H _e	PIC
SP Di 02	20	12	177–216	0,750	0,819	0,774
SP Di 04	16	7	236–245	0,750	0,746	0,686
SP Di 06	19	5	220–225	0,842	0,644	0,558
SP Di 08	20	11	162–208	0,850	0,856	0,816
SP Tri 17	20	16	203–254	0,850	0,895	0,863
průměr		10,2		0,808	0,7922	0,7393

Tabulka 5: Genetická analýza dat – populace 3.

Populace 4						
lokus	počet jedinců	počet alel	délka alel	H _o	H _e	PIC
SP Di 02	19	10	177–207	0,737	0,787	0,744
SP Di 04	18	8	234–246	0,722	0,856	0,811
SP Di 06	19	6	221–207	0,526	0,636	0,571
SP Di 08	20	11	159–190	0,950	0,873	0,835
SP Tri 17	20	8	209–248	0,500	0,565	0,529
průměr		8,6		0,687	0,7433	0,6978

Tabulka 6: Genetická analýza dat – populace 4.

Z tabulek 3 až 6 je dále patrné, že podobný jev nastal v mírnější období u populace 1 a lokusu SP Di 02. Lokus SP Di 06 vykazoval stabilně nejnižší polymorfismus také v případě jednotlivých populací, objevily se nicméně výchyly v pozorované heterozygotitě, která byla nižší u populace 1 a naopak vyšší u populace 3.

Počty alel u populací 1, 2 a 4 dosáhly shodných průměrů 8,6. Populace 3 oproti tomu ve srovnání s ostatními vykazovala v průměru vyšší počet alel (10,2) a také nejvyšší PIC a pozorovanou heterozygotitu.

6. Diskuse

V experimentální části této práce se podařilo získat 5 nových mikrosatelitových markerů pro *Salvia pratensis*, testovaných na 77 jedincích ze čtyř středoevropských populací zkoumaného druhu. U získaných markerů byla provedena analýza základních populačně genetických parametrů, která ukázala, že vykazují značnou úroveň variability, a to jak v celkovém souboru všech jedinců, tak v rámci jednotlivých populací. Zároveň byly zjištěny i jisté rozdíly v populačně genetických parametrech mezi jednotlivými populacemi.

Tyto nově vyvinuté markery budou díky prokázané variabilitě využitelné v dalším výzkumu v oblasti populační genetiky a fylogeografie. Jejich počet je nicméně pro provedení populačně genetické studie příliš nízký, proto ke splnění cílů práce původně stanovených v zadání bude nutné pokračovat v testování dalších kandidátních lokusů. Další možností je využití lokusů vyvinutých pro *S. officinalis*, jejichž cross-amplifikaci u *S. pratensis* prokázali Radosavljević et al. (2011), nicméně vzhledem k neznámým populačně genetickým parametrům těchto lokusů u *S. pratensis* a stále poměrně nízkému celkovému počtu markerů (10) se vývoj dalších markerů jeví jako žádoucí.

Radosavljević et al. (2011) při vývoji nových mikrosatelitových markerů pro *S. officinalis* testovali 18 trinukleotidových kandidátních lokusů, z nichž získali celkem 9 vyhovujících markerů. Poměr úspěšně vyvinutých markerů byl tedy výrazně příznivější.

Malý počet finálně vyvinutých markerů v této práci může být také zčásti způsobený vyřazením některých lokusů, u nichž by se při dalším testování mohla prokázat jejich použitelnost. Jde o ty markery, které byly vyřazeny při první fragmentační analýze produktů PCR na základě slabé nebo žádné amplifikace (v příloze C označené jako „opakovat PCR“). Lze předpokládat, že v některých případech mohlo dojít k chybám například při přípravě reakce, zejména u těch markerů, které v předchozím kroku na agarózovém gelu vykazovaly zřetelné specifické produkty u obou testovaných vzorků DNA (takových bylo vyřazeno celkem 17). Lze také testovat amplifikaci s pozměněným protokolem PCR (snížení teploty pro nasedání primerů).

Dalším vhodným krokem navazujícího výzkumu by bylo testovat cross-amplifikaci vyvinutých markerů u zástupců blízce příbuzných druhů rodu *Salvia* a zjistit, zda je možné markery mezidruhově přenést a jaká je případně jejich variabilita u těchto druhů.

7. Závěr

Předkládaná bakalářská práce představuje experimentální laboratorní testování mikrosatelitových lokusů u druhu *Salvia pratensis* provedené v rámci výzkumu postglaciální migrace druhů suchých trávníků. Těžištěm práce byl vývoj nových mikrosatelitových markerů pro daný druh a testování jejich variability na vzorcích několika středoevropských populací za účelem stanovení základních populačně genetických parametrů.

Cílem práce bylo vyvinout funkční set mikrosatelitových markerů využitelný v populačně genetických studiích druhů suchých trávníků, pro něž *Salvia pratensis* slouží jako modelový zástupce. Tento cíl byl splněn pouze částečně, neboť získaných markerů je příliš malý počet a pro sestavení funkčního setu bude nutné vyvinout další. Jedním z výstupů práce je tedy i návrh dalšího směřování výzkumu v tomto směru, zejména další testování lokusů z této práce vyřazených kvůli neúspěšné amplifikaci.

Úspěšný vývoj pěti markerů vykazujících relativně vysokou variabilitu je nicméně možné považovat za přínos této práce přispívající k usnadnění dalšího výzkumu v oblasti fylogeografie společenstev středoevropských suchých trávníků, případně dalších populačně genetických studií prováděných na druhu *Salvia pratensis*.

8. Seznam použitých zdrojů

Odborné publikace

AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A., SAUNDERS, N. C., 1987: Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489 – 522.

AVISE, J., 2004: *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.

BRETON, C., BESNARD, G., BERVILLÉ, A. A., 2006: Using Multiple Types of Molecular Markers to Understand Olive Phylogeography. Zeder, M. A., Bradley, D. G., Emshwiller, E., Smith, B. D. (eds), 2006: *Documenting Domestication. New Genetic and Archaeological Paradigms*. University of California Press, London.

BUSCHIAZZO, E., GEMMELL, N. J., 2006: The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays* 28, 1040 – 1050.

FREELAND, J. R., KIRK, H., PETERSEN, S. D., 2011: *Molecular Ecology*. Wiley-Blackwell, Oxford.

GUTIÉRREZ-GARCÍA, T. A., VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., 2011: Comparative Phylogeography: Designing Studies while Surviving the Process. *BioScience* 61 (11), 857 – 868.

HÁKOVÁ A., KLAUDISOVÁ A., SÁDLO J. (eds.), 2004: *Zásady péče o nelesní biotopy v rámci soustavy Natura 2000*. Ministerstvo životního prostředí, Praha.

HEGLAND, S. J., VAN LEEUWEN, M., OOSTERMEIJER, J. G. B., 2001: Population structure of *Salvia pratensis* in relation to vegetation and management of Dutch dry floodplain grasslands. *Journal of Applied Ecology* 38, 1277 – 1289.

HEISE, W., BABIK, W., KUBISZ, D., KAJTOCH, Ł., 2015: A three-marker DNA barcoding approach for ecological studies of xerothermic plants and herbivorous insects from central Europe. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177, 576 – 592.

HEWITT, G. M., 2001: Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10, 537 – 549.

HICKERSON, M. J., CARSTENS, B. C., CAVENDER-BARES, J., CRANDALL, K. A., GRAHAM, C. H., JOHNSON, J. B., RISSLER, L., VICTORIANO, P. F., YODER, A. D., 2010: Phylogeography's past, present and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54, 291 – 301.

HODEL, R. G. J., SEGOVIA-SALCEDO, M. C., LANDIS, J. B., CROWL, A. A., SUN, M., LIU, X., GITZENDANNER, M. A., DOUGLAS, N. A., GERMAIN-AUBREY, C. C., CHEN, S., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., 2016: The report of my death was an exaggeration: A

review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences* 4 (6), apps.1600025.

CHYTRÝ, M., KUČERA, T., KOČÍ, M. (eds.), 2001: *Katalog biotopů České republiky*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.

CHYTRÝ, M. (ed.), 2007: *Vegetace České republiky 1: Travinná a keříčková vegetace*. Academia, Praha.

JOHANIDESOVÁ, E., FAJMON, K., JONGEPIEROVÁ, J., PRACH, K., 2014: Spontaneous colonization of restored dry grasslands by target species: restoration process beyond sowing regional seed mixtures. *Grass and Forage Science* 70, 631 – 638.

KAJTOCH, Ľ., CIEŠLAK, E., VARGA, Z., PAUL, W., MAZUR, M., SRAMKÓ, G., KUBISZ, D., 2016: Phylogeographic patterns of steppe species in Eastern Central Europe: a review and implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 25 (12), 2309 – 2339.

MAGYARI, E. K., CHAPMAN, J. C., PASSMORE, D. G., ALLEN, J. R. M., HUNTLEY, J. P., HUNTLEY, B., 2010: Holocene persistence of wooded steppe in the Great Hungarian Plain. *Journal of Biogeography* 37, 915 – 935.

MANDÁK, B., 2011: Mikrosatelity – jejich funkce, význam a použití v současné biologii. *Zprávy České botanické společnosti* 46 (Materiály 25), 79 – 94.

MEINDL, CH., BRUNE, V., LISTL, D., POSCHLOD, P., REISCH, CH., 2016: Survival and postglacial immigration of the steppe plant *Scorzonera purpurea* to Central Europe. *Plant Systematics and Evolution* 2016, 971 – 984.

OUBORG, N. J., VAN TREUREN, R., 1995: Variation in fitness-related characters among small and large populations of *Salvia pratensis*. *Journal of Ecology* 83, 369 – 380.

POKORNÝ, P., CHYTRÝ, M., JUŘIČKOVÁ, L., SÁDLO, J., NOVÁK, J., LOŽEK, V., 2015: Mid-Holocene bottleneck for central European dry grasslands: Did steppe survive the forest optimum in northern Bohemia, Czech Republic? *The Holocene* 25 (4), 716 – 726.

PRAJS, B., ROGALSKI, M., SOTEK, Z., STASIŃSKA, M. (2010): Xerothermic Grassland Communities of the Alliance *Cirsio-Brachypodium pinnati* Hadac et Klika 1944 em. Krausch 1961 in Northwestern Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* 19 (1), 141 – 148.

PROVAN, J., BENNETT, K. D., 2008: Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution* 23 (10), 564 – 571.

RADOSAVLJEVIĆ, I., JAKSE, J., JAVORNIK, B., SATOVIC, Z., LIBER, Z., 2011: New microsatellite markers for *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. *American Journal of Botany* 2011, e316 – e318.

SCHUELKE, M., 2000: An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18, 233 – 234.

SLAVÍK, B., 2000: *Květena České republiky 6*. Academia, Praha.

STEWART, J. R., LISTER, A. M., 2001: Cryptic northern refugia and the origins of modern biota. *Trend in Ecology and Evolution* 16, 608 – 613.

WIESING, K., WÖHRMANN, T., HUETTEL, B., 2015: The use of high-throughput DNA sequencing for microsatellite discovery in plants. Hörandl, E., Appelhans, M. S. (eds), 2015: *Next generation sequencing in plant systematics*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.

ZALAPA, J. E., CUEVAS, H., ZHU, H., STEFFAN, S., SENALIK, D., ZELDIN, E., MCCOWN, B., HARBUT, R., SIMON, P., 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany* 99 (2), 193 – 208.

ZHANG, D., HEWITT, G. M., 2003: Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12, 563 – 584.

Legislativní zdroje

Směrnice Rady č. 92/43/EHS z 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin. Příloha I: *Typy přírodních stanovišť v zájmu společnosti, jejichž ochrana vyžaduje vyhlášení zvláštních oblastí ochrany*.

9. Přílohy

Příloha A: sekvence testovaných primerů

Forward-primer	sekvence forward-primeru
SP-Tetra-01F	GGAAACAGCTATGACCATGTTGTAGTGAATTTTCGACGGG
SP-Tetra-02F	GGAAACAGCTATGACCATCCCTCTAGGATTCGAACTTGTCT
SP-Tetra-03F	GGAAACAGCTATGACCATGCACCATACAACCTCAGGAAG
SP-Tetra-04F	GGAAACAGCTATGACCATACTTTAATTTGAGCCAGACCAATC
SP-Tetra-05F	GGAAACAGCTATGACCATGGAGCGGGAAGGATGTTG
SP-Tetra-06F	GGAAACAGCTATGACCATTTGATGGACTGAACCAC
SP-tetra-07F	GGAAACAGCTATGACCATATAAACGGTGTCTCACAGAAG
SP-Tetra-08F	GGAAACAGCTATGACCATGCATCTTCGCATCGAGGAATTAG
SP-Tetra-09F	GGAAACAGCTATGACCATGAGGTTGCAGTGAGCCAAG
SP-Tetra-10F	GGAAACAGCTATGACCATCAGAGACTCCCAAACAATTTCTAC
SP-Tri-01F	GGAAACAGCTATGACCATGCATTCCGCCACGATTCC
SP-Tri-02F	GGAAACAGCTATGACCATCAAGGAGCTCGAACGACTG
SP-Tri-03F	GGAAACAGCTATGACCATACTTACCGCCTTTAATACAATCC
SP-Tri-04F	GGAAACAGCTATGACCATTTATTCTCTCAGGTATGCC
SP-Tri-05F	GGAAACAGCTATGACCATCGTCTTTGTGAATTATCACCTC
SP-Tri-06F	GGAAACAGCTATGACCATCTCTGAGCTCCCGCAACC
SP-Tri-07F	GGAAACAGCTATGACCATCCCATTTCAGATGAGCAGCATACT
SP-Tri-08F	GGAAACAGCTATGACCATCTTCTCACGGTAACCAACCC
SP-Tri-09F	GGAAACAGCTATGACCATCGTGCAATCCCTCTTGCG
SP-Tri-10F	GGAAACAGCTATGACCATGAAACAAACAGTGGGCCG
SP-Tri-11F	GGAAACAGCTATGACCATGTGCATTAAGAAGAAATGTTCTCG
SP-Tri-12F	GGAAACAGCTATGACCATCTCGTGGAGAGCAATGAC
SP-Tri-13F	GGAAACAGCTATGACCATTAGTCGGTGGCCTGAC
SP-Tri-14F	GGAAACAGCTATGACCATGCTTGAGATGTCGACTG
SP-Tri-15F	GGAAACAGCTATGACCATGTCAAGTCAAATTCTCGCAGG
SP-Tri-16F	GGAAACAGCTATGACCATGTTCTCAATTTCCACCTCCTTTG
SP-Tri-17F	GGAAACAGCTATGACCATGTGCGTTCGTGTCAACAG
SP-Tri-18F	GGAAACAGCTATGACCATGTCTCCAAACTGTCCGGC
SP-Tri-19F	GGAAACAGCTATGACCATAAAGCGACAAACACGAAGG
SP-Tri-20F	GGAAACAGCTATGACCATCCTCCGTCGGTACTTCACC
SP-Tri-21F	GGAAACAGCTATGACCATCGCGTAAAGGACTGCAC
SP-Tri-22F	GGAAACAGCTATGACCATAACACCCGCGGAGCTAAAC
SP-Tri-23F	GGAAACAGCTATGACCATCAAACGGTGTGGAACCGAG
SP-Di-01F	GGAAACAGCTATGACCATCCGCACCTGTGATTACCTTC
SP-Di-02F	GGAAACAGCTATGACCATTCCAGAAATCCTAAATGCCAG
SP-Di-03F	GGAAACAGCTATGACCATCCGCCATCAATTTGTCCAG
SP-Di-04F	GGAAACAGCTATGACCATTCTTTGTACGCGACGG
SP-Di-05F	GGAAACAGCTATGACCATAACCAAGTCTACACTCCAACC
SP-Di-06F	GGAAACAGCTATGACCATCGTTTGGCAGCTTTCAAC
SP-Di-07F	GGAAACAGCTATGACCATAACGAACAAGAGATTTCCGCC
SP-Di-08F	GGAAACAGCTATGACCATGGCGGAGGTATTGTTGCC
SP-Di-09F	GGAAACAGCTATGACCATAAGTAAAGATGCCATTTCCCAC
SP-Di-10F	GGAAACAGCTATGACCATGCCCTCCTAAGCTTTCTCTG
SP-Di-11F	GGAAACAGCTATGACCATGCCTTCCAAGTTTCAACAAATAATG
SP-Di-12F	GGAAACAGCTATGACCATAACAGACCGAATCACAATTTCTCC
SP-Di-13F	GGAAACAGCTATGACCATAACCTTAAATCACACAATAACGG
SP-Di-14F	GGAAACAGCTATGACCATGCGAAAGACCGAAATACCC
SP-Di-15F	GGAAACAGCTATGACCATGGCACCAAGAAATCCTGCC
SP-Di-16F	GGAAACAGCTATGACCATGCACTCCAAGAGACGACC
SP-Di-17F	GGAAACAGCTATGACCATGCCAGGAACTTTCCATTTC
SP-Di-18F	GGAAACAGCTATGACCATAAACCGGGAACAACCTAGGG
SP-Di-19F	GGAAACAGCTATGACCATCGGGCCTACATTTCCAAATC

Reverse-primer	sekvence reverse-primeru
SP-Tetra-01R	GCACAGTTGGATCGGTCAG
SP-Tetra-02R	GGCCTGCATGATGTCTATGG
SP-Tetra-03R	AGTTCAAATCTGGGCCACAAG
SP-Tetra-04R	AGGCCGGTTTAACGGAAATG
SP-Tetra-05R	TGCTTGCCTGCCATTATTCG
SP-Tetra-06R	TTGTGTTCACTTTCCCGGC
SP-tetra-07R	TTCGAGTTCACCACGAGGG
SP-Tetra-08R	TCACCCTTATTTGATCTTCTGACC
SP-Tetra-09R	GGCATTAGGTTCCAGCTACAG
SP-Tetra-10R	TGGAAGTCCAAAGTAACCTG
SP-Tri-01R	GGCATTGATCCACGACGC
SP-Tri-02R	ACCACCTAATATAATTTGGGCCTTG
SP-Tri-03R	GGGCACGAGAGACCATCC
SP-Tri-04R	TCAGTATCCTCTTACCATTGCTTC
SP-Tri-05R	GCTTAATCAAACACGTAACCTGGC
SP-Tri-06R	TTATTGCTGTCACGTGTCCC
SP-Tri-07R	TCCGGGAGAGGAAATTAGCC
SP-Tri-08R	GCTTTAATTGCCCTTTATGCC
SP-Tri-09R	TGTCTAGGAGCTTTATGGACAG
SP-Tri-10R	AAGAACCCGCTGGTGAAG
SP-Tri-11R	TTTGGGAGGTTAGTAATATTTGGG
SP-Tri-12R	TGTTGTTTCTAACATTTGGAGCAC
SP-Tri-13R	GGTACCGAACCGTTTACCAC
SP-Tri-14R	CTTGTTGGTCCCGAAGG
SP-Tri-15R	CGCTTTCGGCTTGTGTAAG
SP-Tri-16R	GGGTCCGGATTCCCTCCG
SP-Tri-17R	CGAAGAAGCTCGTCTCTACAAAG
SP-Tri-18R	CACCATCCTTCAACGCTTC
SP-Tri-19R	AGTTGACGGAGGGAGTACTATG
SP-Tri-20R	CGGTAICTCACGCCCTGC
SP-Tri-21R	TAGGGAGAGGCCCTGGAAC
SP-Tri-22R	ACCCTAAACCCAAGACTGC
SP-Tri-23R	CTGGCAGTGGCAAGAAATTAAG
SP-Di-01R	TTTCAGTTCCACCTCGGC
SP-Di-02R	AGAAGCCGGTAAATTCTCACG
SP-Di-03R	TTGTACAGGAGCGAACACG
SP-Di-04R	AGGGATCTAAGTAGAATCACCAAATG
SP-Di-05R	ACCACCAACTATTATTCTTGACCC
SP-Di-06R	GTCATCAAGAAGCACTGACCC
SP-Di-07R	CTTGTTTAGACTTCATTTGCACC
SP-Di-08R	TCTGCTGCCGCGTATTAC
SP-Di-09R	CGTCAAATTTCCCTGACCAGC
SP-Di-10R	AAAGGGTGATGATTAGTTCTTG
SP-Di-11R	TCGTAAACCAAATATCCGAACCG
SP-Di-12R	GCTACTATCCTGTGCGATGCAC
SP-Di-13R	CTACATACATGTTGAGCTTCGAG
SP-Di-14R	AAACGTGCGAGAATCGGAGC
SP-Di-15R	GCGAAGCCCAAATAAGCCC
SP-Di-16R	TTTGTACCCTTGTTTCATGTAATC
SP-Di-17R	ACATGTCCCTTGATCACCTCC
SP-Di-18R	ACCTCAATCGTCTGGAGCG
SP-Di-19R	AATTTCTCACCATAACGAACCC

Příloha B: První fáze testování, kontrola produktů PCR na gelu

lokus	produkt PCR	poznámka
SP Di 01	OK	oba vzorky
SP Di 02	OK	oba vzorky
SP Di 03	nespecifický	
SP Di 04	OK	oba vzorky
SP Di 05	OK	jeden vzorek
SP Di 06	OK	oba vzorky
SP Di 07	žádný	
SP Di 08	OK	oba vzorky
SP Di 09	OK	oba vzorky
SP Di 10	žádný	
SP Di 11	OK	oba vzorky
SP Di 12	OK	oba vzorky
SP Di 13	OK	jeden vzorek
SP Di 14	OK	oba vzorky
SP Di 15	nespecifický	
SP Di 16	nespecifický	
SP Di 17	OK	jeden vzorek
SP Di 18	OK	oba vzorky
SP Di 19	žádný	
SP Tri 01	OK	jeden vzorek
SP Tri 02	OK	oba vzorky
SP Tri 03	žádný	
SP Tri 04	OK	oba vzorky
SP Tri 05	OK	oba vzorky
SP Tri 06	OK	oba vzorky
SP Tri 07	OK	oba vzorky

lokus	produkt PCR	poznámka
SP Tri 08	OK	oba vzorky
SP Tri 09	OK	jeden vzorek
SP Tri 10	OK	jeden vzorek
SP Tri 11	nespecifický	
SP Tri 12	OK	oba vzorky
SP Tri 13	nespecifický	
SP Tri 14	nespecifický	
SP Tri 15	žádný	
SP Tri 16	OK	jeden vzorek
SP Tri 17	OK	jeden vzorek
SP Tri 18	OK	jeden vzorek
SP Tri 19	OK	oba vzorky
SP Tri 20	nespecifický	
SP Tri 21	nespecifický	
Sp Tri 22	žádný	
SP Tri 23	OK	jeden vzorek
SP Te 01	nespecifický	
Sp Te 02	OK	oba vzorky
SP Te 03	OK	oba vzorky
SP Te 04	OK	oba vzorky
SP Te 05	OK	oba vzorky
SP Te 06	OK	oba vzorky
SP Te 07	OK	oba vzorky
SP Te 08	OK	oba vzorky
SP Te 09	žádný	
SP Te 10	nespecifický	

Příloha C: Lokusy testované fragmentační analýzou

lokus	M 13	další postup
SP Di 01	FAM	M13 FAM
SP Di 02	PET	M13 - PET
SP Di 04	VIC	M13 - VIC
SP Di 05	NED	opakovat PCR
SP Di 06	FAM	M13 - NED
SP Di 08	PET	M13 - FAM
SP Di 09	VIC	M13 - PET
SP Di 11	NED	opakovat PCR
SP Di 12	FAM	opakovat PCR
SP Di 13	PET	opakovat PCR
SP Di 14	VIC	opakovat PCR
SP Di 17	NED	opakovat PCR
SP Di 18	FAM	opakovat PCR
SP Tri 01	PET	opakovat PCR
SP Tri 02	VIC	opakovat PCR
SP Tri 04	NED	opakovat PCR
SP Tri 05	FAM	opakovat PCR
SP Tri 06	PET	opakovat PCR
SP Tri 07	VIC	vyřadit (duplicita)
SP Tri 08	NED	opakovat PCR
SP Tri 09	FAM	vyřadit (duplicita)
SP Tri 10	PET	opakovat PCR
SP Tri 12	VIC	vyřadit (duplicita)
SP Tri 16	NED	opakovat PCR
SP Tri 17	FAM	M13 - VIC
SP Tri 18	PET	opakovat PCR
SP Tri 19	VIC	opakovat PCR
SP Tri 23	NED	opakovat PCR
Sp Te 02	FAM	opakovat PCR
SP Te 03	PET	opakovat PCR
SP Te 04	VIC	opakovat PCR
SP Te 05	NED	opakovat PCR
SP Te 06	FAM	opakovat PCR
SP Te 07	PET	opakovat PCR
SP Te 08	VIC	opakovat PCR

Příloha D: Lokusy vybrané pro testování na všech vzorcích DNA

Výsledky první fragmentační analýzy (7 vzorků DNA).

lokus	počet alel	tvar alel	variabilita	délka alel
SP Di 01	2	bez stutteru	3	142 - 180
SP Di 02	2	normální	6	162 - 206
SP Di 04	2	3 stuttery	7	224 - 254
SP Di 06	2	normální	3	220 - 236
SP Di 08	2	normální	7	164 - 196
SP Di 09	2	normální	6	248 - 270
SP Tri 17	2	normální	4	211 - 238