

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Lenka Krůzová**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Genetická variabilita sbírky genových zdrojů  
*Lactuca serriola* detekovaná pomocí SSR  
markerů**

Bakalářská práce

**Lenka Krůzová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2011**

Vedoucí práce: **RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma “Genetická variabilita sbírky genových zdrojů *Lactuca serriola* detekovaná pomocí SSR markerů“ vypracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Miloslavu Kitnerovi, PhD., dále RNDr. Petru Nádvoříkovi, PhD., RNDr. Luboši Majeskému a RNDr. Ivaně Doležalové, PhD. za jejich cenné rady, odborné připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovali během psaní a vypracovávání mé bakalářské práce. Také děkuji rodičům a sourozencům za psychickou podporu po celou dobu studia.

## Souhrn

Locika kompasová (*Lactuca serriola*) je diploidní jednoletá bylina s autogamickým typem rozmnožování. Patří do rodu *Lactuca*, čeledi *Asteraceae* a řádu *Asterales*. Z hlediska ekologického je považována za typického r-stratéga. Roste na sušších hlinitých půdách na slunných nebo mírně zastíněných místech, důležité jsou živinami bohaté substráty s dostatkem vápníku a dusíku. Vyskytuje se téměř po celé Evropě, dále v severní Africe, Severní Americe, střední Asii, Austrálii, Argentíně, Tasmánii, na Blízkém východě a Novém Zélandu. *L. serriola* je považována za významného progenitora ke komerčnímu šlechtění *L. sativa*, protože křížení *L. serriola* a *L. sativa* probíhá relativně snadno a výsledkem je plně fertlní potomstvo. *L. serriola* tedy tvoří tzv. primární genový pool *L. sativa*.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na výběr 5 polymorfních mikrosatelitových markerů vhodných pro studium genetické variability 88 testovaných položek *L. serriola* z pracovní kolekce rodu *Lactuca* L. uchovávané na Katedře botaniky PřF UP. Byly využity tyto základní laboratorní techniky: izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR) a agarózová a polyakrylamidová elektroforéza.

Celkem bylo testováno 16 mikrosatelitových markerů, z nichž bylo vybráno pět polymorfních markerů, u kterých se počet alel pohyboval od 2 do 7, průměrný počet alel byl 4. Pro tyto markery byly optimalizovány podmínky PCR reakce a doba separace. Použitím tohoto souboru polymorfních markerů na celý testovaný soubor 88 položek *L. serriola* byla zjištěna velmi nízká hodnota průměrné pozorované heterozygotnosti ( $H_o = 0,016$ ). Zjištěná hodnota odpovídá údajům publikovaným v literatuře a odpovídá autogamní povaze studovaného druhu.

Informace získané v této bakalářské práci budou použity při výzkumu genetické variability, biodiverzity, ekologii a dynamice přírodních populací genetických zdrojů rodu *Lactuca*, který v současné době probíhá na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci.

## Summary

Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*) is a diploid one-year herb with autogamic type of reproduction. It belongs to the genus *Lactuca*, *Asteraceae* and order *Asterales*. From the ecological point of view is considered a typical r-strategist. It grows on drier clayey soils in sunny or slightly shaded places and important are nutrient-rich substrates with plenty of calcium and nitrogen. It occurs across most of Europe, then in North Africa, North America, Central Asia, Australia, Argentina, Tasmania, the Middle East and New Zealand. *L. serriola* is considered important for commercial breeding progenitor *L. sativa*, *L. serriola* as crosses and *L. sativa* is relatively easy and the result is a fully fertile offspring. *L. serriola* therefore constitute a primary gene pool of *L. sativa*.

This bachelor work focuses on the selection five polymorphic microsatellite markers suitable for studying the genetic variability of 88 test items by *L. serriola* held at the Department of Botany, Faculty of Science. They were used the following basic lab techniques: DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR) and agarose and polyacrylamide electrophoresis.

It was tested 16 microsatellite markers, of which five were selected polymorphic markers for which the number varied from 2 to 7, the average number of alleles was 4. For these markers were optimized conditions of PCR reaction and the time of separation. Using this set of polymorphic markers on the entire set of items by *L. serriola* found a very low value of the average observed heterozygosity ( $H_O = 0,016$ ) and expected heterozygosity ( $H_E = 0,462$ ). These values corresponds to the data published in the literature and corresponds autogamous nature of the studied species.

Information obtained in this work will be used for research of the genetic variability, biodiversity, ecology and dynamics of natural populations genetic resources of *Lactuca*, which is currently running at the Department of Botany, Palacky University in Olomouc.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>10</b>
3.1	Locika kompasová ( <i>Lactuca serriola</i> L.).....	10
3.1.1	Taxonomické zařazení.....	10
3.1.2	Morfologie rodu <i>Lactuca</i> L. ....	11
3.1.2	Morfologická charakteristika lociky kompasové ( <i>Lactuca serriola</i> L.).....	11
3.1.3	Ekogeografie <i>L. serriola</i> .....	13
3.1.4	Vztah <i>Lactuca serriola</i> L. k pěstovanému salátu <i>Lactuca sativa</i> L. ....	14
3.2	Repetitivní sekvence DNA .....	15
3.2.1	Satelity.....	15
3.2.2	Minisatelity.....	16
3.2.3	Mikrosatelity.....	16
3.2.3.1	Mikrosatelitní markery u rodu <i>Lactuca</i> .....	19
3.3	Polymerázová řetězová reakce.....	21
3.3.1	Elektroforetická separace PCR produktů .....	21
3.3.2	Problémy při hodnocení PCR produktů .....	22
<b>4</b>	<b>Materiál a metody.....</b>	<b>25</b>
4.1	Biologický materiál.....	25
4.2	CTAB extrakce DNA z čerstvých listů rostlin .....	29
4.3	PCR amplifikace .....	30
4.4	Elektroforéza.....	33
4.4.1	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	33
4.4.2	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	34
4.4.2	Interpretace výsledků a zpracování dat .....	36
4.5	Použité roztoky .....	37
4.6	Použité chemikálie.....	39
4.7	Laboratorní přístroje .....	40
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>53</b>





# 1 Cíle práce

1. Shromáždit dostupné literární zdroje a vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Zvládnout základní laboratorní techniky – izolaci DNA, optimalizaci PCR, agarózovou a polyakrylamidovou elektroforézu.
3. Testovat SSR markery publikované u rodu *Lactuca* na menším počtu genotypů *Lactuca serriola*.
4. Vybrat 3 – 5 polymorfních markerů a aplikovat je na kolekci cca osmdesáti položkách *L. serriola*.

## 2 Úvod

Mikrosatelity (STRs – *single tandem repeats*, SSRs – *simple sequence repeats*) jsou tandemové repetice s délkou základní jednotky opakování v jednotkách bází, nejčastěji však od 1 do 6 bp. Existence mikrosatelitů byla poprvé objevena v 70. letech 20. Století (Weising *et al.*, 2005). V současné době jsou mikrosatelity považovány za jedny z nejvíce populárních molekulárních markerů. Jsou aplikovány v mnoha biologických a lékařských oborech, jako např. v populačně genetických a fylogenetických studiích, diagnostice chorob, určování otcovství apod. Důvodem je jejich vysoký polymorfismus a relativně snadná interpretace výsledků. Mezi jejich hlavní nedostatky patří skutečnost, že musejí být izolovány *de novo* z organismů, které mají být předmětem dané studie, a s tím spojená časová i finanční náročnost jejich vývoje (Zane *et al.*, 2002).

Jednou z alternativ odstranění těchto nedostatků je využití veřejně dostupných genomických zdrojů založených na genových markerech SSR. Jako vhodné řešení se ukázal rychlý a levný vývoj SSR z cDNA (DNA kopií vzniklých zpětným přepisem – reverzní transkripcí z mRNA) neboli EST. Kromě toho EST databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace) obsahuje stále více cDNA sekvencí, které lze využít pro relativně levný a rychlý rozvoj velkého počtu takzvaných EST-SSRs. EST-SSRs také poskytují i snadněji interpretovatelná data ve srovnání s jejich anonymními protějšky (Ellis *et* Burke, 2007).

Tato bakalářská práce je zaměřena na nalezení 5 polymorfních markerů (EST-SSR) pro studium genetické variability 88 položek *L. serriola*. Pro tyto účely byly použity tyto základní laboratorní techniky: izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), agarózová a polyakrylamidová elektroforéza.

### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Locika kompasová (*Lactuca serriola* L.)

##### 3.1.1 Taxonomické zařazení

Systematické zařazení lociky kompasové (*Lactuca serriola*) podle Woodlanda (2009):

Říše:	Plantae
Oddělení:	Krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída:	Dvouděložné (Magnoliopsida)
Řád:	Hvězdicotvaré (Asterales)
Čeleď:	Hvězdicovité (Asteraceae)
Rod:	Locika ( <i>Lactuca</i> L.)
Druh:	Locika kompasová ( <i>Lactuca serriola</i> L.)

Čeleď hvězdicovité (*Asteraceae*) patří mezi největší a celosvětově rozšířené skupiny kvetoucích rostlin (Heywood, 1978). Tato čeleď obsahuje cca 1 200 rodů a 20 000 druhů (Slavík *et al.*, 2004). Dělíme ji do tří podčeledí, kterými jsou *Barnadesioideae*, *Cichorioideae* a *Asteroideae* zahrnující 17 tribů (Bremer *et al.*, 1994). Tribus *Lactuceae* patří do podčeledi *Cichorioideae* (Tomb, 1977), který se dále dělí do 10 monofyletických podtribů včetně podtribu *Lactucinae* (Gemeinholzer *et* Kilian, 2005). Tento podtribus zahrnuje 17 rodů (včetně rodu *Lactuca*) a přibližně 270 druhů (Bremer *et al.*, 1994).

Rod *Lactuca* L. patří do skupiny *Cichorium*, podskupiny *Crepis* (Jeffrey, 1995) a zahrnuje asi 100 druhů, 17 z nich se vyskytuje v Evropě, 40 v Asii, 33 v Africe, 10 v Americe (Lebeda *et al.*, 2004). Evropské druhy rodu *Lactuca* se rozdělují do 4 hlavních sekcí *Phoenixopus*, *Mulgenium*, *Lactucopsis*, *Lactuca* (Feráková, 1977). Název rodu *Lactuca* pochází z latinského slova „*lacteo*“ (v překladu „mít mléko“), zástupci tohoto rodu mají v pletivech mléčnice, které v centrální vakuole obsahují latex (mléčnou šťávu). V kontaktu se vzduchem latex tuhne a hnědne (Feráková, 1977; Lebeda, 1998).

### 3.1.2 Morfologie rodu *Lactuca* L.

Do rodu *Lactuca* patří jednoleté, dvouleté nebo vytrvalé byliny. Mají často vřetenovité až řepovitě ztlustlé kořeny, přímé nebo vystoupavé a jednoduché nebo v horní části větvené lodyhy, které mohou být lysé, chlupaté, štětinaté nebo ostnité. Listy jsou střídavé, jednoduché, členěné, méně často celistvé a na žilnatině a na okrajích často ostnité. Tvoří početné a zpravidla drobné úbory se 4 – 25 (někdy až 50) květy skládající vrcholičnaté, latovité, hroznovité nebo klasovité květenství. Listeny jsou šupinovité, na bázi střelovité nebo hrálovité. Zákrov je 20 mm dlouhý, nejčastěji válcovitý, vzácně kulovitý. Zákrovní listeny bývají lysé nebo na vrcholu brvitě a na špičce často fialové. Lůžko úboru je ploché a bez plevok. Květy jsou jazykovité se žlutou ligulou, která je na vnější straně někdy načervenalá nebo modrá, vzácně může být i bílá. Korunní trubka je zděli poloviny liguly. Prašnicková trubička je žluté barvy a má krátké přívěsky. Blizna je dvouramenná a tato ramena jsou nitřovitá. Nažky jsou stlačené, zobánkaté, obvykle žebernaté a na okraji úzce křídlaté, bez zobánku 3 – 15 mm dlouhé, 1 – 2 mm široké, vzácně mohou zobánky chybět. Chmýr 2 – 7 mm dlouhý, bílý nebo nažloutlý, paprsky jednoduché, stejně dlouhé a opadavé (Slavík *et al.*, 2004).

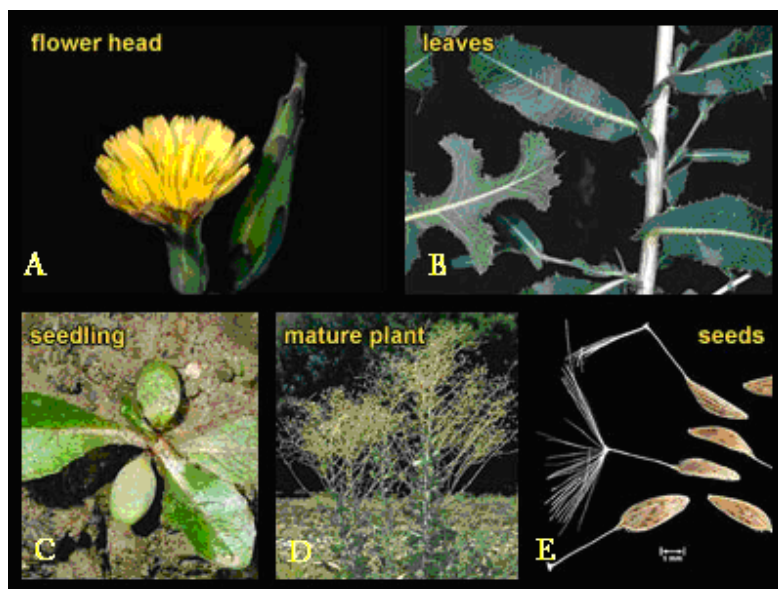
### 3.1.2 Morfologická charakteristika lociky kompasové (*Lactuca serriola* L.)

Druh *Lactuca serriola* se řadí do sekce *Lactuca* a subsekce *Lactuca*. Díky vysoké variabilitě ve tvaru listů, počtu trichomů, antokyanové pigmentaci a množství vosku porývajících epidermis uvádí Feráková (1977) tři variety druhu – *L. serriola* var. *coriacea*, *L. serriola* var. *serriola* s peřenolaločnatými a peřenosečnými listy a *L. serriola* var. *integrata* s celistvými listy. Prince *et* Carter (1977) rozdělují druh do dvou forem založené taktéž na variabilitě listů. Jedná se o *L. serriola* f. *serriola* (peřenoalochnaté listy) a *L. serriola* f. *integrifolia* (listy s celistvým okrajem).

Locika kompasová (*L. serriola*) patří mezi jednoleté byliny s vřetenovitým kořenem. Její lodyha je tuhá, přímá, plná, lysá nebo dole štětinatá, v horní části větvená a může být 50 – 180 cm vysoká. Barva lodyhy může být bělavá, někdy díky antokyanům červeně až fialově naběhlá. Její listy jsou tuhé, sivozelené, až 25 cm dlouhé, na spodní straně na střední žilce osténkaté a přisedají srdčitou až hrálovitou bází. Přízemní listy jsou v obrysu obkopynaté, nejčastěji peřenodílné, vzácněji mohou být i celistvé. Lodyžní listy jsou hluboce členěné

a úkrojky na okrajích listů zubaté nebo osténkaté. Rostou svisele a jsou postavené v severojižním směru (odtud český druhový název „kompasová“). Tímto způsobem se rostlina brání silnému ozáření a přehřátí listů během poledních hodin. Úbory se nejčastěji s 8 – 15 (někdy až 35) květy skládají v husté, latnaté a bohaté květenství se šupinovitými, kopinatými listeny přisedlými střelovitou bází. Zákrovní listeny jsou šupinovité, mají kopinatý tvar a střelovitou bázi a vyskytují se ve 3 - 4 řadách. Květy jsou uspořádané ve dvou kruzích. Většinou jsou světle žluté a sušením mohou slabě modrat. Počet chromozomů:  $2n = 18$  (Slavík *et al.*, 2004).

Nažky jsou relativně malé, většinou 3 – 4 mm dlouhé,  $\pm 1$  mm široké, zploštělé, obvejčité, s 5 – 10 žebry a jemnými osténky směřují k vrcholu. Barva je většinou šedohnědá až šedavá. Bělavý nitkovitý zobánek bývá stejně dlouhý nebo delší než tělo nažky (Slavík *et al.*, 2004). Nažky se šíří především větrem (Brant *et Holec*, 2004), protože mají chmýr (*pappus*), který je vždy monomorfní sestávající ze dvou rovných řad bělavých štětín. Na jejich vrcholu jsou jemné háčky různých velikostí a tvarů. Skládají se ze dvou nebo tří svislých řad buněk (Feráková, 1977). Rozdíly v nažkách závisejí na mnoha faktorech. Morfologie nažek významně koreluje s ekogeografickými vlastnostmi – zeměpisnou délkou, šířkou a půdní strukturou stanovišť. Nažky *L. serriola* f. *serriola* jsou kratší, tenčí a mají vyšší počet žeber ve srovnání s f. *integrifolia* (Novotná *et al.*, 2011).



**Obrázek 1:** Locika kompasová (*Lactuca serriola*): A) květ, B) listy, C) sazenice, D) zralá rostlina, E) semena.

Zdroj: [http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/WEEDS/prickly\\_lettuce.html](http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/WEEDS/prickly_lettuce.html)

### 3.1.3 Ekogeografie *L. serriola*

Z hlediska klimatických podmínek se *L. serriola* vyskytuje od nížin až do hor. Optimální nadmořská výška jejího výskytu je 200 až 600 m. n. m. (Feráková, 1977). Vyskytuje se téměř po celé Evropě, dále v severní Africe (Kanárské ostrovy, od Maroka po Tunisko, Egypt), na Blízkém východě a ve střední Asii (Slavík *et al.*, 2004). Postupně byla zavlečena do Austrálie, Tasmánie a na Nový Zéland a Havaj, do Argentiny a Severní Ameriky (Burbinge *et Gray*, 1970; Webb *et al.*, 1988). V České republice se vyskytuje ve fytochorioech termofytika a nižších a teplejších částí mezofytika. Na přechodnou dobu proniká i do vyšších poloh mezofytika (do nadmořských výšek 500 – 600 m) a oreofytika (Slavík *et al.*, 2004).

*L. serriola* je z hlediska ekologického považována za typického r-stratéga (Feráková, 1977). Vyskytuje se na okrajích komunikací, navážkách zeminy, kamenolomech, ruderalizovaných okrajích polních kultur, rumišťích a akátinách. Roste na sušších hlinitých půdách na slunných nebo mírně zastíněných místech, důležité jsou živinami bohaté substráty s dostatkem vápníku a dusíku (Slavík *et al.*, 2004). Dobře se jí daří v rostlinných společenstvech ozimých jednoletých a dvouletých druhů rostoucích na narušených stanovištích [kokoška pastuščí tobolka (*Capsela bursa pastoris*), hluchavka objímavá (*Lamium amplexicaule*), rdesno ptačí (*Polygonum aviculare*) apod.] (Feráková, 1977; Amor, 1986).

Hooftman *et al.* (2006) zjistili, že během posledních 60 let výskyt *L. serriola* prudce vzrostl a rostliny nyní zabírají širší škály vegetačních typů. Invaze nových stanovišť pravděpodobně úzce souvisí s lidskou činností (Lebeda *et al.*, 2001, 2004), jako je doprava a další aktivity, které vytvářejí optimální stanoviště pro *L. serriola*.

Hybridizace mezi druhy rostlin může vést k ekologickým změnám v druhu a zvyšuje jejich potenciál stát se invazivními. Rostoucí důkazy naznačují, že rozšíření *L. serriola* by (částečně) mohlo být způsobeno hybridizací s jejími nejbližšími příbuznými (*L. sativa*). (Hooftman *et al.*, 2006).

### 3.1.4 Vztah *Lactuca serriola* L. k pěstovanému salátu *Lactuca sativa* L.

*L. sativa* je jednou z nejvýznamnějších a široce rozšířených listových zelenin, která se běžně pěstuje ve velkovýrobních podmínkách. Její blízkce příbuznou rostlinou je *L. serriola* (Slavík *et al.*, 2004). Současné studie považují *L. serriola* za přímého předka *L. sativa* (Kesseli *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1996; Witsenboer *et al.*, 1997). *Lactuca serriola* je považována za významného progenitora ke komerčnímu šlechtění *L. sativa*, protože křížení *L. serriola* a *L. sativa* probíhá relativně snadno a výsledkem je plně fertlní potomstvo (F1 generaci) mezidruhových hybridů, což potvrzuje jejich blízký příbuzenský vztah. *L. serriola* tedy tvoří tzv. primární genový pool *L. sativa* (Lebeda *et al.*, 2007).

Genový pool je termín značící zásobu genů schopných vzájemné genetické výměny v daném čase a tedy dostupných pro šlechtění daného druhu rostliny. Součástí primárního genového poolu jsou primární genové zdroje. Primárním genovým zdrojem je kulturní druh nebo jeho blízký příbuzný druh. Tyto položky i druhy lze snadno křížit (Doležalová *et al.*, 2001). Mezi druhy spadající do primárního genového poolu patří tedy kromě *L. serriola* i *L. acuelata*, *L. scarioloides*, *L. azerbaijanica*, *L. georgica* a *L. dregeana*, do sekundárního genového poolu se zařazuje *L. saligna* a do terciárního genového poolu *L. virosa* (Zohary, 1991).

Genové zdroje *L. serriola* jsou tedy považovány za velmi důležité zdroje mnoha šlechtitelsky využitelných vlastností, včetně odolnosti proti chorobám, odolnost ke škůdcům, chorobám, abiotickým faktorům a hrají nezastupitelnou roli při šlechtění *L. sativa* (Lebeda *et al.*, 2007).

## 3.2 Repetitivní sekvence DNA

Prokaryotické organismy obsahují ve svém genomu DNA, jejíž většina kóduje určitý protein, tRNA nebo rRNA. V malém množství se v genomu vyskytuje i nekódující oblast, která má především regulační funkci. Kódující sekvence nukleotidů probíhá od začátku do konce bez přerušení. Naproti tomu eukaryotický genom je tvořen kódující DNA a DNA, která nekóduje protein ani RNA. Tato část DNA v genomu eukaryot procentuelně převažuje a je tvořena introny a repetitivní DNA (Campbell *et* Reece, 2006).

Repetitivní DNA je složena z nukleotidových sekvencí, které jsou v genomu přítomny v mnoha kopiích (Campbell *et* Reece, 2006). Repetitivní sekvence DNA můžeme na základě jejich organizace v genomu rozdělit na rozptýlené a tandemové. Rozptýlené sekvence reprezentují hlavně transpozóny a představují velkou část genomu (Weising *et al.*, 2005). Jak název napovídá, jednotlivé jednotky opakování nejsou uspořádány v řadě za sebou, ale jsou v DNA rozptýlené. Délka jednoho motivu je obvykle sto až tisíc párů bází a jeho kopie jsou podobné, avšak často ne identické (Campbell *et* Reece, 2006). Dělíme je na dvě skupiny, kterými jsou krátké rozptýlené repetice SINEs (*short interspersed repeats*) a dlouhé rozptýlené repetice LINEs (*long interspersed repeats*) (Carter, 2000).

Tandemová opakování jsou uspořádané za sebou a skládají se ze dvou až několika tisíců sekvencí (Weising *et al.*, 2005). Tandemová repetitivní DNA se svým nukleotidovým složením liší od zbytku buněčné DNA, což způsobuje odlišnou hustotu a umožňuje její izolaci diferenční ultracentrifugací. Repetitivní DNA, která byla izolována tímto způsobem, se označovala jako satelitní DNA. Nyní se pojem satelitní DNA používá pro tandemové repetitivní sekvence všeobecně (Campbell *et* Reece, 2006). Dále se pro tandemové repetitivní sekvence používá označení VNTRs (*variable number of tandem repeats*). Tyto sekvence lze klasifikovat z hlediska délky a množství kopií základního motivu na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Weising *et al.*, 2005).

### 3.2.1 Satelity

Satelitní DNA byla poprvé popsána v 70. letech 20. století a byla pojmenována díky oddělitelnosti od zbytku DNA na základě hustotního gradientu. Je tvořena 1 000 až více než 100 000 kopiemi základního motivu. Délka jednoho motivu se obvykle pohybuje ve stovkách párů bází. V buňce satelity často tvoří heterochromatin a jsou lokalizovány



v subtelometrických a telometrických oblastech chromozómů. Tento typ tandemových repeticí se jen velmi zřídka používá jako molekulární marker (Weising *et al.*, 2005).

### 3.2.2 Minisatelity

Jako další tandemové repetice byly v roce 1985 popsány minisatelity. Jejich repetitivní jednotky jsou většinou několik desítek (nejčastěji 10 – 60 bp) dlouhé a ve srovnání se satelity mají méně repeticí. Minisatelity byly klonovány a sekvencovány z několika organismů. Jako molekulární markery byly využívány různými způsoby. V jedné metodě se sondy komplementární k minisatelitům hybridizovaly na restričně štěpenou genomickou DNA k produkci vysoce variabilního délkového polymorfismu restričních fragmentů (RFLP). Tato technika byla značně používána v minulosti, v dnešní době se již minisatelity jako molekulární markery tak často nepoužívají (Weising *et al.*, 2005).

### 3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity (STRs – *single tandem repeats*, SSRs – *simple sequence repeats*) jsou dalším typem tandemových repeticí. Délka jejich základní jednotky opakování se pohybuje v jednotkách bází, nejčastěji však od 1 do 6 bp. Existence mikrosatelitů byla poprvé popsána v 70. letech 20. století v satelitní DNA kraba poustevníka. Od té doby se mikrosatelity hojně využívají v mnoha molekulárních studiích a jejich přítomnost byla dokumentována v genomech bakterií, hub, rostlin i živočichů (Weising *et al.*, 2005). Nyní jsou mikrosatelity považovány za jedny z nejvíce populárních molekulárních markerů používaných s různými aplikacemi v mnoha biologických a lékařských oborech (např. populačně genetické a fylogenetické studie, diagnostika chorob, určování otcovství apod.). Důvodem je jejich vysoký polymorfismus a relativně snadná interpretace výsledků. Mezi jejich hlavní nedostatky patří skutečnost, že musejí být izolovány *de novo* z organismů, které mají být předmětem studie (Zane *et al.*, 2002).

Mikrosatelity se nejčastěji rozdělují z hlediska délky jejich základního motivu na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové. Mezi nejčastěji zastoupené mikrosatelity patří di- a trinukleotidové. U savců se hojně vyskytují motivy (A)<sub>n</sub> a dinukleotidová sekvence (CA)<sub>n</sub>, u rostlin se zase často vyskytují motivy (A)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub> a (GAA)<sub>n</sub>. Mononukleotidová opakování z A/T nukleotidů jsou také přítomny v genomu chloroplastů (Weising *et al.*, 2005).

Dalším kritériem pro rozdělení mikrosatelitů je jejich přerušovaný či nepřerušovaný výskyt v genomu. Dělí se tedy na jednoduché, přerušované a složené. Jednoduchými mikrosatelity jsou ty, které se vyskytují v řadě za sebou nepřerušovaně (např.  $(AT)_n$ ). Dále se jedná o typ přerušovaný, kdy jsou po sobě jdoucí jednotky repetice přerušeny náhodným sledem nukleotidových sekvencí (např.  $(AT)_n$  CTG  $(AT)_n$ ). A poslední typ mikrosatelitů dělený podle tohoto kritéria se nazývá složený, kdy jsou mikrosatelity složeny z více motivů opakování (např.  $(AT)_n$   $(CT)_n$ ) (Oliveira *et al.*, 2006).

Vývoj mikrosatelitních markerů lze obecně rozdělit na tři hlavní způsoby. Při klasickém postupu vývoje jsou mikrosatelity izolovány z DNA daného druhu (z genomických knihoven), který chceme testovat. Její základní kroky spočívají v již zmíněné izolaci genomické DNA a jejího následného rozštípání pomocí restričních endonukleáz nebo ultrazvuku. Restriční fragmenty se dále podrobí elektroforetické separaci v agarózovém gelu. Na základě výsledků z elektroforetické separace se vyselektují fragmenty o délce 300 - 700 párů bází. Tyto fragmenty se pak vkládají do plazmidového vektoru a takto upravený vektor se transformuje do kompetentních bakteriálních buněk. Dále se klony testují, zda obsahují mikrosatelitové repetice, a selektují se díky navázaným probám. Takto vyselektované klony se namnoží a osekvenují. Proveďte se konstrukce primerů, které jsou specifické pro daný mikrosatelitový lokus (Zane *et al.*, 2002).

Tato metoda získávání nových mikrosatelitů je velmi finančně i časově náročná. Proto se častěji používají mikrosatelitové lokusy již izolované z blízkce příbuzného druhu. Tato metoda se nazývá *cross-species* PCR amplifikace (Primmer *et al.*, 1996). U mikrosatelitů, které jsou polymorfní, pak dochází k optimalizaci PCR podmínek a doby elektroforetické separace.

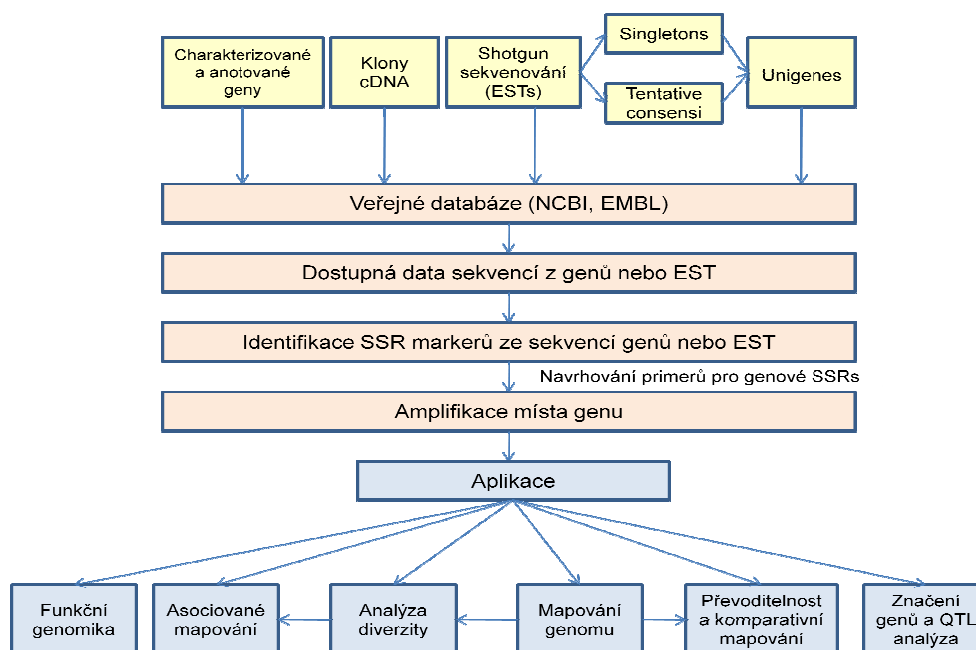
Díky již výše zmíněným nedostatkům SSR markerů a problémům vycházejících ze způsobu jejich klasického vývoje se nyní používají i SSR markery odvozeny z databází EST (expressed sequence tag – „místa s expresní adresou“). V dnešní době je dostatek veřejně dostupných dat sekvencí DNA, včetně velkých sbírek EST z mnoha různých taxonů. Primery použité k amplifikaci při PCR jsou často druhově přesné, což znamená, že markery, které pochází z jednoho taxonu, nelze dobře aplikovat na druh jiný. Jedním z možných řešení je využití veřejně dostupných genomických zdrojů založených na genových markerech SSR, které jsou více přenositelné přes taxonomické hranice (Ellis *et* Burke, 2007). Jako vhodné řešení se ukázal rychlý a levný vývoj SSR z cDNA (DNA kopií vzniklých zpětným přepisem – reverzní transkripcí z mRNA) neboli EST (Snustad *et* Simmons, 2009). Kromě toho EST

databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace) obsahuje stále více cDNA sekvencí, které jsou nezbytné pro efektivní rozvoj velkého počtu takzvaných EST-SSRs. EST-SSRs také poskytují i snadněji interpretovatelná data ve srovnání s jejich anonymními protějšky (Ellis *et al.*, 2007).

Tyto EST-SSR jsou tedy s úspěchem využívány jako molekulární markery, protože jejich vývoj je relativně levný, představují geny již transkribované a jejich domnělé funkce mohou být často odvozeny díky vyhledávání homologů. Protože jsou odvozeny z přepisů, jsou užitečné pro analýzu funkčních rozmanitostí přírodních populací nebo sbírky genových zdrojů (Varshney *et al.*, 2005).

Použitím specializovaných počítačových programů lze data pro EST, geny a cDNA klony stáhnout z GenBanku a prohledat za účelem identifikace SSR. Následně jsou navrženy specifické primery k EST-SSR nebo mohou být navrženy tak, aby zesílily mikrosatelitní lokusy přítomné v genech (Varshney *et al.*, 2005). Obecný postup vývoje a využití EST-SSR je shrnut na Obrázku 2.

**Obrázek 2:** Schéma navrhování a využití EST-SSRs.



Vývoj univerzálních markerů, které mohou být analyzovány v rámci různých taxonů a jsou uvnitř taxonů polymorfní, může usnadnit i srovnávací studie a fylogenetické analýzy. Chapman *et al.* (2007) popsal vývoj těchto markerů pro použití v čeledi Asteraceae, která zahrnuje plodiny salátu, slunečnice a světlice, stejně jako desítky důležitých plodin a plevelů. Použitím alignmentu (porovnávání) COS (*conserved orthologous set*) z ESTs od hlávkového

salátu, slunečnice a DNA sekvencí *Arabidopsis*, byly navrženy sady párů primerů. Bylo testováno 192 párů primerů v 8 druzích z celé čeledi, přičemž 163 těchto primerů bylo amplifikováno alespoň v 1 taxonu, 125 bylo amplifikováno alespoň v polovině taxonů a 39 párů primerů bylo amplifikováno ve všech 8 druzích. Porovnání sekvencí v hlávkovém salátu a slunečnice v databázi EST naznačovala, že drtivá většina z nich bude polymorfní. Jako test užitečnosti těchto markerů byla seřazena podmnožina deseti lokusů z jednotlivců světlice. Devět z deseti těchto testovaných lokusů bylo polymorfních. Tyto výsledky navíc naznačily, že tato místa jsou fylogeneticky informativní, a proto může být použito k řešení evolučních vztahů mezi taxony i v rámci druhu.

### 3.2.3.1 Mikrosatelitní markery u rodu *Lactuca*

V rámci rodu *Lactuca* bylo doposud publikováno pouze několik prací využívajících mikrosatelity (Alexander *et al.*, 2009; Van de Wiel *et al.*, 1999, 2010). Publikované primerové sekvence byly do roku 2008 známy pouze u dvou mikrosatelitních markerů, popřípadě jsou primerové sekvence chráněny (Alexander *et al.*, 2009, Van de Viel *et al.*, 1999, 2010). Zřejmě i z tohoto důvodu byla například variabilita rezistence genových zdrojů rodu *Lactuca* k plísni salátové v posledních letech studována pomocí těchto dvou mikrosatelitních markerů označených jako MSAT15-34 a MSATE6 (Okubara *et al.*, 1997, Sicard *et al.*, 1999, Shen *et al.*, 2002, Kuang *et al.*, 2004, 2008). MSAT15-34 leží v intronu a MSATE6 v kódující oblasti regionu RGC2. Zkratkou RGC (*Resistance Gene Candidate*) se označují tzv. clustery genů rezistence vůči plísni salátové (Okubara *et al.*, 1997, Wroblewski *et al.*, 2007). U rodu *Lactuca* byly popsány celkem čtyři RGC regiony.

V roce 2008 byla publikována sada 61 mikrosatelitních markerů navržených a testovaných na *L. sativa* (Simko, 2008). Tato sada je výsledkem tzv. „*in silico*“ vývoje SSR markerů. Markery jsou vyvíjeny pomocí specializovaného softwaru podle databází nukleotidových sekvencí, Jsou tedy odvozeny pro postižení variability kódujících částí genomu (tzv. EST-SSR markery). Výhodou je nižší časová a finanční náročnost vývoje takových markerů. Simko ve své studii pracoval s databázemi EST sekvencí (Expressed Sequence Tag) z *L. sativa* cv. Salinas a *L. serriola* (UC96US23), které jsou veřejně k dispozici na CGPDB (*Compositae Genome Project database*; <http://compgenomics.ucdavis.edu/>). K identifikaci mikrosatelitních sekvencí použil software SSRIT a primerové sekvence byly navrženy pomocí softwaru PRIMER3. Úspěšně

amplifikované SSR markery byly označeny jako SML (*Salinas microsatellites for lettuce*). Tyto nově odvozené EST-SSR markery byly testovány na souboru obsahující 96 položek *L. sativa*, obsahující hlavní morfotypy pěstovaného salátu, a tři planě rostoucí druhy *L. serriola*, *L. saligna*, a *L. virosa*. (Simko, 2008).

EST-SSR markery byly také využity ve studii Riar *et al.* (2011). Locika kompasová (*L. serriola*) je v severozápadním Pacifiku problematickým plevelem a nedávno si vyvinula rezistenci vůči herbicidu 2,4-D. Protože neexistují žádné veřejně dostupné SSR markery na 2,4-D gen rezistence v *L. serriola*, byla vypracována studie na vývoj SSR markerů z EST databáze pro pět druhů *Lactuca*. Nalezeno bylo celkem 15 970 SSR mezi 57 126 EST patřící do 5 druhů *Lactuca*. Nejhojnějšími motivy SSR byly trinukleotidové repetice. Byl vybrán reprezentativní vzorek pro navrhování primerů SSR z EST a také byly hledány údaje pro *L. sativa* a *Helianthus annuus*. Analýzy ukázaly, že EST-SSR lze využít v 82 % všech druhů a 68 % rodů Asteraceae, což potvrdilo převoditelnost těchto markerů v rámci jednotlivých rodů a prokázalo svou užitečnost při studiu genetické rozmanitosti. Tuto skutečnost potvrdila i studie Pashley *et al.* (2006), která využívala EST-SSR markery v genetické analýze slunečnice. Bylo zjištěno, že EST-SSR jsou 3krát více přenositelné do jiných druhů než klasické SSR.

Vedle mikrosatelitů se při studiu variability přírodních populací a genofondových sbírek uplatňují i další typy proteinových a molekulárních markerů izoenzymy (Kesseli *et al.*, 1986; Lebeda *et al.*, 2009), RFLP (Kesseli *et al.*, 1991, 1994), RAPD (Waycott *et al.*, 1994), TRAP markery (Hu *et al.*, 2003) a především metoda AFLP (Hill *et al.*, 1996; Koopman *et al.*, 2001; Kitner *et al.*, 2008; Lebeda *et al.*, 2009; Van de Wiel *et al.*, 2010). Metoda AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* = délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů) umožňuje rozdělit studované rostliny na základě DNA genotypizace a vytvořit jim tzv. fingerprint, a to bez nutnosti znalosti jejich konkrétní DNA sekvence. Principem této metody je v prvním kroku štěpení molekuly DNA restričními enzymy a navázání oligonukleotidových adaptérů na konce restričních fragmentů. V dalším kroku jsou provedeny dvě PCR amplifikace (pre-amplifikace a selektivní amplifikace) a následná separace produktů na denaturačním polyakrylamidovém gelu (Vos *et al.*, 1995). AFLP je považována za spolehlivou a reprodukovatelnou metodou používanou pro detekci genetické variability v kolekcích genových zdrojů různých rostlin a v hodnocení biodiverzity (Ayad *et al.*, 1997, Jones *et al.*, 2009, Spooner *et al.*, 2005), zahrnující i rod

*Lactuca* spp. (Koopman *et al.*, 2001, Dziechciarková *et al.*, 2004, Jansen *et al.*, 2006, Kitner *et al.*, 2008, Kuang *et al.*, 2008, Lebeda *et al.*, 2009, van Treuren *et van Hintum*, 2009).

### 3.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR = Polymerase Chain Reaction) je základní technika molekulární biologie a nedílnou součástí výzkumných prací všech laboratoří ve světě. Tato metoda se používá k mnohonásobnému namnožení (amplifikaci) DNA, je velmi citlivá, specifická a rychlá. Je založena na principu replikace molekul nukleových kyselin a využívá se při ní katalýzy enzymem DNA polymerázou.

Reakční směs sestává z jednotlivých složek, kterými jsou templátová DNA, forward a reverse primery (krátké oligonukleotidy DNA), 4 deoxyribonukleotidtrifosáty – dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) a DNA polymeráza. Pro správné fungování reakce a správnou koncentraci a pH reakční směsi se dále přidává pufr (dle použité DNA polymerázy) a deionizovaná voda. Do některých reakčních směsí se dále přidává BSA (bovinní sérový albumin) a hořečnaté ionty ve formě MgCl<sub>2</sub>.

Celková reakce se skládá ze tří základních kroků, které se cyklicky opakují. Těmito kroky jsou denaturace, annealing a extenze. Při denaturaci dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi dusíkatými bázemi a následně k rozvolnění dvoušroubovice DNA. Tato část probíhá za teploty 94 - 98 °C po dobu 20 – 30 sekund. Poté se reakční směs ochladí na 40 – 65 °C, celý tento krok trvá 20 – 40 sekund. Zde dochází k nasednutí a hybridizaci primerů na příslušná místa denaturované DNA. Třetím a posledním krokem PCR je další zvýšení teploty na 72 °C, kdy DNA polymeráza začne syntetizovat nové vlákno DNA na základě komplementarity bází, a to ve směru od 3' k 5' konci templátové DNA. Vzniknou dvě molekuly DNA, které se skládají z jednoho templátového a druhého nově nasyntetizovaného řetězce DNA. Zde končí jeden cyklus a další začíná zvýšením teploty na 94 – 98 °C, kdy začne probíhat další denaturace. Množství DNA roste exponenciálně a k dostatečné amplifikaci je potřeba 30 – 40 cyklů (Šmarda *et al.*, 2005).

#### 3.3.1 Elektroforetická separace PCR produktů

K analýze PCR produktů se nejčastěji využívá techniky elektroforézy. Molekuly DNA, které jsou díky fosfátům záporně nabitě, putují v elektrickém poli směrem od katody k anodě a zároveň se rozdělují podle hmotnosti a velikosti fragmentů DNA v gelu

(agarózovém, polyakrylamidovém), který funguje jako trojrozměrné síto. Velikost pórů závisí na koncentraci připravovaného gelu. Nejmenší fragmenty putují nejrychleji a největší se nejvíce zpožďují. Gel je v elektroforetické komůrce v kontaktu v příslušném pufru (v případě agarózové elektroforézy je v něm ponořen), který udržuje stálé pH, teplotu a vede elektrický proud. Vzorky se do jamek v gelu nanášejí společně s nanášecím pufrem a barvivem (např. bromfenolová, xylenová modř). Díky vyšší hustotě pufru zůstanou vzorky v jamkách a barvivo nám umožní sledovat, jak rychle vzorky putují v gelu. Pro možnost stanovení velikosti fragmentů DNA se do gelu přidává tzv. marker molekulové hmotnosti, což je směs fragmentů DNA s definovanou velikostí. K vizualizaci separovaných PCR produktů dochází barvením dusičnanem stříbrným (v případě elektroforézy v polyakrylamidovém gelu), ethidium bromidem (agarózová elektroforéza) nebo jinými fluorescenčními barvivy (Šmarda *et al.*, 2005; Zima *et al.*, 2004).

Metoda barvení stříbrem byla vyvinuta jako způsob ultrasenzitivní detekce polypeptidů po separaci polyakrylamidovou elektroforézou (Merril *et al.*, 1981) a později i pro detekci nukleových kyselin (Sommerville *et al.*, 1981; Hering *et al.*, 1982; Blum *et al.*, 1987). Původní citlivost metody byla 5 - 7,5 pg DNA na mm<sup>2</sup> (Beidler *et al.*, 1982). Postupně byly publikovány různé modifikace detekce ve směru zvýšení citlivosti, omezování použití toxických chemikálií, snížení použitých kroků při barvení nebo separaci a zlepšení tzv. pozadí. Zvýšení citlivosti na 1 pg mm<sup>2</sup> bylo dosaženo použitím formaldehydu ve fázi impregnace gelu dusičnanem stříbrným za současného snížení koncentrace dusičnanu (Bassam *et al.*, 1991). Omezení „pozadí“ (šedé zbarvení gelu zhoršující vizuální hodnocení) bylo dosaženo použitím thiosíranu sodného a použitím kyseliny dusičné nebo dichromanu sodného pro omezení oxidace gelu. Metoda barvení stříbrem poskytuje výsledky srovnatelné s metodami detekce pomocí fluorescenčního značení fragmentů nebo autoradiografické detekce (Comicini *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1999, Creste *et al.*, 2001).

### **3.3.2 Problémy při hodnocení PCR produktů**

Mikrosatelity jsou považovány za populární a všestranné molekulární markery v oblasti populační genetiky a evolučních studií. Pozorované mikrosatelitové alely jsou DNA fragmenty o různé velikosti, amplifikované specifickými primery pomocí PCR reakce a tyto PCR produkty jsou dále vizualizovány pomocí elektroforézy. Při hodnocení vizualizovaných

PCR produktů mohou nastat problémy, a to především v podobě nulových alel, homoplazie alel nebo přítomnosti tzv. stutter bandů.

### **Nulové alely**

Vysoce polymorfní mikrosatelitní markery jsou široce využívány v populačně genetických studiích, určování biologického rodičovství a studiu reprodukčních systémů. Jednou z nevýhod je přítomnost nulových alel. Podle definice je nulová alela místo mikrosatelitu, které nelze amplifikovat na detekovatelnou úroveň pomocí polymerázové řetězové reakce (Dakin *et* Avise, 2004). Problémy jsou způsobeny bodovými mutacemi v sekvencích obklopujících mikrosatelit, kde nasedají primery (tzv. *flanking regions*). Tyto mutace pak brání hybridizaci primerů k templátové DNA během amplifikace a absence PCR produktů pak vede k detekci nulových alel. Mezi další příčiny vzniku nulových alel patří preferenční amplifikace krátkých alel a *slippage* (sklouznutí) DNA polymerázy při PCR (Chapuis *et* Estoup, 2006). Vzhledem ke kompetitivní povaze PCR jsou kratší alely často amplifikovány efektivněji než ty delší. Tak by se mohlo stát, že i u heterozygotního jedince by byla zjištěna jen jedna alela, a byl by tedy označen za homozygota. Dalším původem detekce nulových alel může být selhání PCR v důsledku nedostatečně kvalitní templátové DNA nebo její nízkou koncentrací (Dakin *et* Avise, 2004).

Nulové alely mohou mít velký vliv na odhad diference populace například tím, že snižuje genetickou rozmanitost v populaci. Mohou být detekovány v populačních studiích testováním Hardy-Weinbergova (HW) zákona (za předpokladu, že pozorovaný nedostatek heterozygotů nemá jiný původ, například Wahlundův efekt) (Chapuis *et* Estoup, 2006). V dnešní době nulové alely nejlépe detekují počítačové programy, které dokáží vyhodnotit odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Jones *et* Ardren, 2003; Peakall *et* Smouse, 2006).

I když byly nulové alely nalezené v širokém rozsahu taxonů, některé taxony mají obzvláště vysokou frekvenci výskytu nulových alel. Příkladem jsou hmyz a měkkýši. Je zajímavé, že se jedná o druhy s velkou efektivní velikostí populace. Vztah mezi přítomností nulových alel a vysoce variabilními oblastmi už byla opakovaně prokázána v několika molekulárních studiích. Několik studií také naznačuje, že doprovodné sekvence mikrosatelitů mohou být méně stabilní než sekvence v dalších oblastech genomu (Angers *et* Bernatchez, 1997). Naproti tomu nebyl nalezen žádný vztah mezi frekvencí nulových alel a jednotkou opakování a délkou motivu mikrosatelitů (Chapuis *et* Estoup, 2006).



## **Homoplazie alel**

Alelová homoplazie je definovaná jako stav, při kterém jsou alely délkově stejné, ale vznikly odlišně. Alely se tedy jeví jako totožné, ale dochází k maskování evolučních vztahů. Výskyt homoplazie souvisí se způsobem vzniku nových mutací a také rychlosti jejich vzniku. Homoplazie je stálým tématem ve fylogenezi a evoluci, ale vzhledem k častému používání mikrosatelitů jako molekulárních markerů fenomén homoplazie alel stále více přitahuje pozornost populačních genetiků (Angers *et al.*, 2000).

Homoplazické alely můžeme rozdělit do dvou skupin. První z nich jsou alely, které vznikly odlišným způsobem, ale jsou stejně dlouhé a mají stejné sekvence. Druhá skupina homoplazických alel jsou alely se stejnou délkou, ale s různými sekvencemi. Ty můžeme určit sekvenováním nebo pomocí SSCP - jednořetězcového konformačního polymorfismu (Angers *et al.*, 2000).

Ve většině případů studia populačně genetických vztahů však homoplazické alely nezpůsobují velké problémy, je-li testováno dostatečné množství mikrosatelitů. Je to z důvodu určité kompenzace vysokou variabilitou mikrosatelitových lokusů (Estoup *et al.*, 2002).

## **Stutter bandy**

Stutter bandy nebo jinak označované *shadow bandy* jsou častým problémem při vyhodnocování PCR produktů při elektroforéze. Při PCR amplifikaci fragmentů DNA někdy dochází k tzv. *slippage* (sklouznutí) DNA polymerázy při replikaci, což způsobí vznik o něco kratších fragmentů DNA. Ty jsou kratší o 2, 4 a někdy i více nukleotidů. Při vyhodnocování elektroforetogramu pak tyto stutter bandy pozorujeme jako světlejší proužky nacházející se pod hlavní alelou. Interpretace výsledků obvykle není složitá, někdy však může dojít k problému v hodnocení alely, která má stejnou délku jako stutter bandy alely jiné (Walsh *et al.*, 1996).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

V této bakalářské práci byla zpracována část vzorků pocházející z pracovní kolekce rodu *Lactuca* L. uchovávaná na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci. Tyto položky byly sesbírány Prof. Ing. Alešem Lebedou, DrSc během sběrových expedic do USA a Kanady v letech 2002, 2004, 2006. Pro výběr a testování EST-SSR markerů byl vybrán podsoubor 88 položek. Geografická data k jednotlivým vzorkům jsou prezentována v Tabulce 1. Rostliny byly po dobu vegetace (duben - září) pěstovány za standardních podmínek ve skleníku (teplota ve dne 18 - 30 °C, v noci 12 - 16 °C) v plastových kontejnerech se zahradním substrátem.

**Tabulka 1:** Pasporní data analyzovaných položek genových zdrojů *Lactuca serriola*.

Položka	Lokalita	Region (provincie)	Zem. šířka	Zem. délka	Nadm. výška (m)
14/02	Toronto	Ontario (Canada)	43° 40' 0N	79° 25' 0W	105
15/02	Toronto	Ontario (Canada)	43° 40' 0N	79° 25' 0W	105
16/02	Madison	Wisconsin	43° 4' 23N	89° 24' 4W	267
18/02	Dodgeville	Wisconsin	42° 57' 37N	90° 7' 48W	365
20/02	Cedar Rapids	Iowa	42° 0' 30N	91° 38' 38W	243
26/02	Ames	Iowa	42° 2' 5N	93° 37' 11W	281
28/02	Carroll	Iowa	42° 3' 57N	94° 52' 0W	388
29/02	Crawfordsville	Iowa	41° 14' 39N	91° 33' 43W	218
32/02	Ute	Iowa	42° 3' 1N	95° 42' 22W	367
34/02	Smithland	Iowa	42° 13' 45N	95° 55' 50W	333
35/02	Sioux Falls	South Dakota	43° 32' 60N	96° 42' 0W	456
36/02	Sioux Falls	South Dakota	43° 32' 60N	96° 42' 0W	456
38/02	Chamberlain	South Dakota	43° 48' 39N	99° 19' 49W	446
39/02	Chamberlain	South Dakota	43° 48' 39N	99° 19' 49W	446
40/02	Kyle	South Dakota	43° 25' 30N	102° 10' 34W	904

**Tabulka 1:** Pokračování

<b>Položka</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Region (provincie)</b>	<b>Zem. šířka</b>	<b>Zem. délka</b>	<b>Nadm. výška (m)</b>
42/02	Wounded Knee	South Dakota	43° 8' 26N	102° 21' 55W	976
43/02	Hot Springs	South Dakota	43° 25' 54N	103° 28' 26W	1094
47/02	Buffalo	Wyoming	44° 20' 54N	106° 41' 54W	1407
49/02	Buffalo	Wyoming	44° 20' 54N	106° 41' 54W	1407
50/02	Ten Sleep	Wyoming	44° 2' 3N	107° 27' 2W	1354
52/02	Manderson	Wyoming	44° 16' 10N	107° 57' 48W	1199
53/02	Cody	Wyoming	44° 31' 35N	109° 3' 21W	1531
54/02	Tower Falls	Wyoming	44° 54' 59N	110° 24' 58W	1943
55/02	Tower Falls	Wyoming	44° 54' 59N	110° 24' 58W	1943
56/02	Alpine	Wyoming	43° 10' 31N	111° 2' 2W	1716
59/02	Idaho Falls	Idaho	43° 28' 0N	112° 1' 60W	1432
60/02	Idaho Falls	Idaho	43° 28' 0N	112° 1' 60W	1432
62/02	Salt Lake City	Utah	40° 45' 39N	111° 53' 25W	1308
64/02	Moab	Utah	38° 34' 24N	109° 32' 57W	1266
66/02	Monticello	Utah	37° 52' 17N	109° 20' 32W	2135
67/02	Blanding	Utah	37° 37' 27N	109° 28' 39W	1832
68/02	Bluff	Utah	37° 17' 4N	109° 33' 4W	1329
70/02	Tuba City	Arizona	36° 8' 6N	111° 14' 21W	1504
71/02	Williams	Arizona	35° 14' 58N	112° 11' 25W	2071
74/02	Las Vegas	Nevada	36° 10' 30N	115° 8' 11W	599
75/02	Sequoia Mobile Home Park	California	37° 28' 49N	122° 12' 10W	14
76/02	Ponderosa	California	36° 6' 20N	118° 31' 38W	2192
77/02	Springville	California	36° 7' 49N	118° 49' 2W	320
79/02	Exeter	California	36° 17' 46N	119° 8' 28W	110
80/02	Pinehurst	California	36° 41' 43N	119° 0' 56W	1226
82/02	Fresno	California	36° 44' 52N	119° 46' 17W	90

**Tabulka 1:** Pokračování

<b>Položka</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Region (provincie)</b>	<b>Zem. šířka</b>	<b>Zem. délka</b>	<b>Nadm. výška (m)</b>
85/02	Coalinga	California	36° 8' 23N	120° 21' 33W	203
86/02	Lockwood	California	35° 56' 12N	121° 4' 50W	276
87/02	Paso Robles	California	35° 37' 36N	120° 41' 24W	229
88/02	Salinas	California	36° 40' 40N	121° 39' 16W	15
30/04	Montreal	Quebec	45° 30' 0N	73° 34' 60W	52
32/04	Montreal	Quebec	45° 30' 0N	73° 34' 60W	52
34/04	Montreal	Quebec	45° 30' 0N	73° 34' 60W	52
43/04	Montreal	Quebec	45° 30' 0N	73° 34' 60W	52
49/04	Montreal	Quebec	45° 30' 0N	73° 34' 60W	52
53/04	Montreal	Quebec	45° 30' 0N	73° 34' 60W	52
58/04	Saint Clothilde	Quebec	45° 10' 0N	73° 41' 0W	52
63/04	Sherrington	Quebec	45° 11' 0N	73° 30' 57W	63
70/04	Sherrington	Quebec	45° 11' 0N	73° 30' 57W	63
73/04	El Dorado Hills	California	38° 41' 9N	121° 4' 52W	248
77/04	Vista	California	33° 12' 0N	117° 14' 30W	120
80/04	Donner Lake Village	California	39° 19' 31N	120° 17' 5W	1812
81/04	Priest	California	37° 48' 51N	120° 16' 18W	730
83/04	Lemoore	California	36° 18' 3N	119° 46' 55W	59
86/04	Visalia	California	36° 19' 49N	119° 17' 28W	90
88/04	Yosemite Forks	California	37° 22' 2N	119° 37' 51W	817
92/04	Medford	Oregon	42° 19' 36N	122° 52' 28W	425
93/04	Roseburg	Oregon	43° 13' 0N	123° 20' 26W	140
95/04	Corvallis	Oregon	44° 33' 53N	123° 15' 39W	60
97/04	Astoria	Oregon	46° 11' 17N	123° 49' 48W	33
100/04	Hoffstadt Bridge, Mt.St.Helen	Washington	46° 12' 0.17" N	122° 11' 21 W	780
105/04	Cave Junction	Oregon	42° 9' 47N	123° 38' 49W	425

**Tabulka 1: Pokračování**

<b>Položka</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Region (provincie)</b>	<b>Zem. šířka</b>	<b>Zem. délka</b>	<b>Nadm. výška (m)</b>
106/04	Crescent City	California	41° 45' 22N	124° 12' 2W	5
107/04	Crescent City	California	41° 45' 22N	124° 12' 2W	5
108/04	Garberville	California	40° 6' 1N	123° 47' 38W	247
109/04	Eureka	California	40° 48' 8N	124° 9' 45W	12
112/04	Navarro	California	39° 9' 7N	123° 32' 27W	120
113/04	Calistoga	California	38° 34' 44N	122° 34' 43W	137
51/06	San Juan Bautista	California	36° 50' 44N	121° 32' 13W	83
52/06	Santa Cruz	California	36° 58' 27N	122° 1' 47W	20
53/06	Santa Clara	California	37° 21' 15N	121° 57' 15W	22
56/06	Minturn	California	37° 8' 23N	120° 16' 24W	68
57/06	Catheys Valley	California	37° 25' 57N	120° 5' 49W	394
59/06	El Portal	California	37° 40' 29N	119° 46' 59W	728
61/06	Bishop	California	37° 21' 49N	118° 23' 39W	1279
62/06	Mesquite	Nevada	36° 48' 20N	114° 3' 59W	486
64/06	Spring Dale subdivision	Utah	40° 40' 13N	111° 52' 25W	1294
65/06	Zions Park, Checkerboard Messa	Utah	40° 42' 30N	111° 50' 30W	2033
67/06	Red Canyon, Hatch	Utah	37° 38' 59N	112° 26' 1W	2128
69/06	Escalante	Utah	37° 46' 13N	111° 36' 5W	1768
71/06	Monticello	Utah	37° 52' 17N	109° 20' 32W	2135
72/06	Tuba City	Arizona	36° 8' 6N	111° 14' 21W	1504
73/06	Williams	Arizona	35° 14' 58N	112° 11' 25W	2071

## 4.2 CTAB extrakce DNA z čerstvých listů rostlin

Pro extrakci DNA byl použit modifikovaný CTAB protokol (Kump *et Javornik*, 1996). Postup lze shrnout v následujících krocích:

1. 200 mg čerstvého rostlinného materiálu (mladých listů) bylo spolu s tekutým dusíkem dobře rozetřeno ve vychlazené třecí misce. Rozetřený materiál byl rovnoměrně přenesen do dvou 2ml eppendorfek a do každé z nich bylo přidáno po 1 ml extrakčního pufru CTAB zahřátého na 69 °C (CTAB pufr byl po použití přenesen zpět do vodní lázně).
2. Eppendorfky s homogenizátem byly dále inkubovány ve vodní lázni nejméně dvě hodiny při teplotě 65 °C.
3. K homogenizátu bylo přidáno 500 – 600 µl roztoku chloroform + izoamylalkohol v poměru 24:1, vytvořila se suspenze. Směs se nechala 5 minut stát.
4. Eppendorfky se směsí byly přeneseny do nechlazené centrifugy a centrifugovány 10 – 15 minut při 11 000 ot·min<sup>-1</sup> (11,2 rcf).
5. Supernatant byl odpipetován do nové zkumavky popsané číslem vzorku a datem extrakce na víčku.
6. Do zkumavky bylo přidáno 60 µl octanu sodného (4 °C) a 500 µl vychlazeného izopropanolu. Zkumavka byla dále 1 - 2 krát převrácena a přenesena na 20 – 30 minut do mrazáku (-20 °C).
7. Následovala centrifugace v nechlazené centrifuze 10 – 15 minut při 11 000 ot·min<sup>-1</sup> (11,2 rcf).
8. Supernatant byl opatrně slit do kádinky tak, aby na dně zkumavky zůstal drobný matně bílý pelet DNA, zbytky roztoku byly vysušeny opatrným převrácením eppendorfky na filtrační papír.
9. K peletu DNA bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu. Zkumavka byla protřepána a poté nechána 5 minut stát.
10. Následně proběhla centrifugace při 11 000 ot·min<sup>-1</sup> (11,2 rcf) po dobu tří minut.
11. Supernatant byl slit, špičkou odsán roztok kolem peletu, který byl ponechán volně vyschnout. Po vyschnutí se pelet zprůhlednil.
12. K peletu bylo přidáno 40 µl TE pufru a zkumavka byla protřepána a krátce stočena (10 sekund).
13. DNA v TE pufru byla rozpuštěna ve 100 µl dd H<sub>2</sub>O.

14. Pro dlouhodobé uskladnění byla DNA uchována v mrazáku při -80°C.

### 4.3 PCR amplifikace

Pro výběr a testování vhodných mikrosatelitních markerů byly použity primerové sekvence EST-SSR markerů publikované v práci Simka (2008). Z celkového množství 61 markerů bylo v prvním kroku vybráno 15 (viz Tabulka 2) EST-SSR, které v původní práci vykazovaly vysoké hodnoty variability. Tyto markery byly testovány na čtyřech položkách *L. serriola* pomocí PCR, agarózové a polyakrylamidové elektroforézy. Detailní popis přípravy a průběhu agarózové a polyakrylamidové elektroforézy je uveden v následující kapitole (4.4 Elektroforéza). Pro pět nejvíce variabilních markerů byla dále provedena detailní optimalizace podmínek PCR a tyto markery byly použity pro genotypizaci souboru 88 položek *L. serriola*. Následuje podrobný popis pracovního postupu.

**Tabulka 2:** Testované mikrosatelitové lokusy u lociky kompasové. Tabulka zahrnuje název markeru testovaného mikrosatelitového lokusu, sekvence primerů a jejich označení v CGPDB (*Compositae Genome Project Database*) a očekávané motivy (upraveno podle Simko, 2008).

Marker (testovaný mikrosateli- tový lokus)	EST/CGPDB	Sekvence primerů (5'→3')	Očekávané motivy	
			<i>L. saliva</i> (Salinas)	<i>L. serriola</i> (UC96US23)
SML-001	QGC15N13	F: CCATGGATCCTGTGTGAAGA R: CACCATGTTCCACTTCCACTT	CATGAT	-
SML-002	QGH4c05	F: GTGATTGCATGCCAAATGAA R: TTAGTAGCCCGCATGCTTTT	-	TTC
SML-013	Cntg-4755	F: TCCCATGATGGAGAGACTCA R: CCCAAAAGGGAATAGCAACC	GAA...CTG	GAA...CTG
SML-015	Cntg-1438	F: TTGAGGAGGGCATTACGTC R: GAGGCGTATCTCCAAGGTGT	TGTTA	-
SML-019	Cntg-1238	F: AAGGAGGAAAGTATGGTGAGGA R: TGAAATGAAGCAACACACGA	ATATG	ATATG
SML-020	Cntg-419	F: GTGGTCGTGATGATGCTTTG R: TGCAATCCCTCTTTTCTTCAA	AATG	AATG
SML-021	Cntg-1077	F: TTGGGAGAATTTTCATTTCCA R: AGTCATCTTTTTCACCCACA	TA	TA
SML-022	Cntg-1211	F: GGGCCTCAAATCCTCTCTG R: TGTTCTTCCCCTCTTTGGAA	ATC	ATC

**Tabulka 2:** Pokračování

Marker (testovaný mikrosateli- tový lokus)	EST/CGPDB	Sekvence primerů (5'→3')	Očekávané motivy	
			<i>L. saliva</i> (Salinas)	<i>L. serriola</i> (UC96US23)
SML-038	Cntg-4846	F: ACCTCCTCCGTCACCAAGT R: TCGCAAATTTTCTTGCCTTT	CCA	CCA
SML-039	Cntg-5632	F: ATTACCCCTGGCCTTATGCT R: TCGTATCTTGGCTGCTCCAT	CCCCTT	CCCCTT
SML-043	Cntg-649	F: TTCTTTCGCCATCTGAAAC R: AAACAGGGGGCTAACGATCT	T	T
SML-045	Cntg-7478	F: ACAAACCGTTTCACCCAAA R: AGCCCTGTCTCTTCAGGAT	AAG	AAG
SML-054	Cntg-3649	F: CCATGCCATGCAGTATACCTT R: AAAAATGACTGCATACTTTGTGAA	TA	TA
SML-055	Cntg-3666	F: CTGCGTGTTTTAAGCCGTTT R: TCCATAATAATATAATCGCACCAA	-	TGA...ATG
SML-056	QGE4h11	F: GCCTAGTCCAATTGCTTTGC R: CAGCTTAACATACTTTTGTTCATTCA	-	TTA
SML-057	QGB14L18	F: TCCCATGATGGAGAGACTCA R: CCCAAAAGGGAATAGCAACC	GAA...CTG	-

Při zjišťování polymorfismu 16 testovaných mikrosatelitových lokusů bylo složení PCR směsi následující (objemy pro 4 vzorky DNA včetně zahrnutých ztrát při pipetování):

Deionizovaná voda	9,25 µl
Reakční pufr (5x BAA)	10,0 µl
Primer F (2,5 µmol.l <sup>-1</sup> )	5,0 µl
Primer R (2,5 µmol.l <sup>-1</sup> )	5,0 µl
dNTPs (100 µmol.l <sup>-1</sup> )	10,0 µl
Go Taq DNA polymeráza (5U.µl <sup>-1</sup> )	0,75 µl

Jednotlivé složky byly napipetovány do 1,5ml zkumavky v uvedeném pořadí, zkumavka byla dále řádně promíchána a reakční směs byla rozpipetována do PCR stripů po 8 µl. Do těchto mikrozkuvek pak byly přidány 2 µl DNA o koncentraci 5 ng.µl<sup>-1</sup>. Stripy



byly krátce zcentrifugovány. Vzorky byly umístěny do termocycleru s následujícím časovým a teplotním profilem:

1) 95 °C	2 min	} 35 cyklů
2) 95 °C	1 min	
3) $T_a$	1 min	
4) 72 °C	30 s	
5) 72 °C	5 min	
6) 10 °C	neomezeně	

Annealingová teplota ( $T_a$ ) byla nejprve stanovena na 57 °C. Pro hrubé ověření průběhu PCR reakce byly PCR produkty podrobeny elektroforetické separaci v agarózovém gelu. Jestliže bandy PCR produktů byly přítomny, byla  $T_a$  zvyšována o 2 °C, pokud PCR produkty přítomny nebyly,  $T_a$  se snížila o 2 °C. Tyto PCR produkty byly dále pro vlastní genotypizaci separovány v polyakrylamidovém gelu. Po vizualizaci dusičnanem stříbrným bylo vybráno 5 markerů, u kterých byly detekovány alespoň dvě různé alely. Pro tyto markery byly dále optimalizovány podmínky PCR, zejména optimalizace  $T_a$  provedením gradientové PCR s annealingovou teplotou od 60 do 66 °C. Po elektroforetické separaci byla vybrána vhodná  $T_a$ . Tato  $T_a$  byla použita při testování všech 88 položek *L. serriola*. Po separaci PCR produktů na 6% polyakrylamidovém gelu a jejich vizualizaci byla  $T_a$  případně upravována a separace opakována. Při optimalizovaných podmínkách se PCR produkty jeví jako jasné a ostré hnědočerné proužky.

Složení reakční směsi pro 88 vzorků DNA izolované z lociky kompasové včetně zahrnutých ztrát při pipetování:

Deionizovaná voda	856,44 μl
Reakční pufr (5x BUFF)	270,0 μl
dNTPs (5 mmol.l <sup>-1</sup> )	54,0 μl
Primer F (10 μmol.l <sup>-1</sup> )	27,0 μl
Primer R (10 μmol.l <sup>-1</sup> )	27,0 μl
Go Taq DNA polymeráza (5U.μl <sup>-1</sup> )	7,56 μl

Jednotlivé složky byly napipetovány do 1,5ml zkumavky v uvedeném pořadí, zkumavka byla dále řádně promíchána a reakční směs byla rozpipetována do PCR stripů po 13,8  $\mu$ l. Do těchto mikrozkušavek pak bylo přidáno 1,2  $\mu$ l DNA o koncentraci 7 ng. $\mu$ l<sup>-1</sup>. Stripy byly krátce zcentrifugovány. Vzorky byly umístěny do termocycleru s optimalizovaným teplotním profilem pro každý marker zvlášť. Časový průběh PCR zůstal nezměněn.

## **4.4 Elektroforéza**

### **4.4.1 Elektroforéza v agarózovém gelu**

Pro hrubé ověření PCR reakce byla provedena agarózová elektroforéza. Produkty obarvené ethidium bromidem byly vizualizovány UV zářením. Celý postup probíhal následovně:

1. Byl připraven 1,4% agarózový gel smícháním 2,8 g agarózy a 200 ml 0,5x TBE pufru. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě tak, aby vznikl čirý roztok bez viditelných částic agarózy.
2. Po dokonalém rozvaření agarózy byla láhev s roztokem opatrně otevřena a 70 ml gelu opatrně přelito do kádinky, kde byl zchlazen (na 50 – 60 °C).
3. Během chlazení gelu byla připravena elektroforetická komůrka s vloženým hřebínkem tak, aby jamky pro nanášení vzorků byly blíže katodě.
4. Po zchlazení roztoku na teplotu, kdy bylo možné kádinku udržet v ruce, bylo přidáno 2  $\mu$ l ethidium bromidu a směs byla promíchána.
5. Gel byl nalit do připravené vaničky tak, aby vznikl gel o výšce 0,5 – 0,8 cm. Gel byl ponechán 30 - 40 minut tuhnout.
6. Po ztuhnutí gelu byl vytažen hřebínek, vanička s gelem byla přenesena do elektroforetické komůrky, do které byl doplněn 0,5x TBE pufr.
7. Do každé jamky bylo dáno po 2  $\mu$ l vzorku (s nanášecím pufrem).
8. Po nanesení všech vzorků byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí s nastavením na 300 V.
9. Po 15 – 25 minutách byla elektroforéza zastavena, vypnuta a kabely byly odpojeny.

10. Gel byl opatrně vyjmut z elektroforetické komůrky, přebytečný pufr odstraněn pomocí papírových ubrousků.
11. Na gelu byly po přenesení na fotodokumentační zařízení zviditelněny PCR produkty pomocí UV záření a gel byl na tomto zařízení vyfotografován.

#### **4.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Pro vlastní genotypizaci vzorků byla provedena polyakrylamidová elektroforéza, která má ve srovnání s agarózovou elektroforézou vyšší separační schopnosti. Byl použit 6% PAA gel a separace PCR produktů proběhla na přístroji T-REX. U tohoto přístroje jsou používány dva typy skel - „sklo s výřezem“, které je ošetřeno přípravkem na odpuzování vody zabraňujícím navázání gelu na toto sklo. Sklo, které je dále v textu označováno jako „velké sklo“, je ošetřováno sloučeninou 3 – methakryloxypropyltrimethoxysilan, která zajišťuje navázání polyakrylamidu na sklo. Obě skla jsou ošetřenými stranami přiložena k sobě, mezi ně se na kraje skel vkládají spacery určující tloušťku gelu. Vzniklý prostor mezi oběma skly se vyplní roztokem gelu a gel se nechá zpolymerizovat. Po separaci vzorků se skla oddělí a dál se pracuje pouze s větším sklem s nalepeným gelem. Po vizualizaci lze takto připravený gel na skle dlouhodobě archivovat. Pracovní postup je následující:

##### **Příprava denaturačního 6% polyakrylamidového gelu a elektroforetická separace PCR produktů**

1. Sklo s výřezem bylo ošetřeno pod vodovodní vodou, dd H<sub>2</sub>O. Sklo bylo setřeno papírovým ručníkem a ošetřeno ethanolem a přípravkem na odpuzování vody (Rain Repellent).
2. Větší sklo, na kterém bude přilepený, obarvený a usušený gel s fragmenty, bylo vyčištěno saponátem pomocí kartáče, opláchnuto vodovodní a pak destilovanou vodou. Sklo bylo dále ošetřeno směsí kyseliny octové v 96% ethanolu (100 ml 96% ethanolu + 500 µl kyseliny octové), 3 – methakryloxypropyltrimethoxysilanu (působí jako tzv. *molekulární lepidlo* - zajišťuje navázání polyakrylamidu na sklo) a ethanolem.
3. Na ošetřené větší sklo byly položeny spacery a sklo s výřezem (skla byla přiložena ošetřenými stranami směrem k sobě), skla k sobě byla fixována svorkami.

4. Gel byl připraven smícháním 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu, 10% roztoku peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  a N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu (TEMED).
5. Roztokem gelu byl naplněn prostor mezi skly, mezi skla byl následně zasunut hřebínek (rovnou stranou do gelu zhruba 0,5 cm hluboko), skla byla zafixována dalšími svorkami a byla ponechána 60 minut stát, aby gel zpolymerizoval.
6. Po hodině byla skla omyta, vyčištěna, připevněna do elektroforetické komůrky a zalita 0,5x TBE puřrem. Hřebínek byl vytažen a prostor mezi skly vyčištěn.
7. Elektroforetická komůrka byla připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastaveného na výkon 75 W a proud a napětí na maximum: 2200 V, 120 mA a skla byla nahřívána 45 minut.
8. Během nahřívání skel byl nahříván termocycler na 96 °C. Vzorky z PCR byly smíchány s denaturačním puřrem s formamidem v poměru 2:1. Deneturance proběhla po přemístění vzorků na vytemperovaný termocycler po dobu tří minut.
9. Během denaturace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, katodový prostor byl otevřen a proudem puřru z injekční stříkačky znovu vyčištěn prostor pro hřebínek, do této mezery byl následně zasunut hřebínek tak, aby zoubky hřebínku zasahovaly asi 1 mm hluboko do gelu.
10. Po 3 minutách byly vzorky vytaženy z termocycleru do chladítka. Vzorky byly nanášeny po 3  $\mu\text{l}$  do mezer mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků do gelu byl uzavřen katodový prostor a připojena aparatura ke zdroji napětí. Na zdroji stejnosměrného elektrického proudu byla jako limitní faktor nastavena hodnota výkonu 65 W (hodnoty elektrického napětí i proudu byly nastaveny na maximum: 2200 V, 120 mA). Čas separace vzorků závisel na molekulárních hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů (obvykle 1 – 3 hodiny).

### **Vizualizace elektroforetogramu**

1. Během elektroforetické separace byly připraveny 4 roztoky: fix/stop roztok (10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 1%  $\text{HNO}_3$ , 0,1%  $\text{AgNO}_3$  a vývojka (3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
2. Po uplynutí času separace vzorků byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojeny obě elektrody a připojen ventil na odvodní trubičku, kterou vytekl elektrodový puřr do sběrného prostoru. Byly povoleny šrouby úchytů skel

- a gel se skly byl přenesen a položen na vodorovnou plochu. Z prostoru mezi skly byl vytažen hřebínek a spacery, poté byla skla od sebe pomocí nože skla oddělena.
3. Velké sklo s přilepeným gelem bylo přeneseno do fotomisky (gelem směrem nahoru), umístěno na třepačku a zalito fix/stop roztokem, jeho doba působení byla přibližně 20 minut (do vymytí proužku xylenové modři z gelu).
  4. Fix/stop roztok byl slit zpět do baňky a sklo s gelem bylo 4 krát po 2 minutách promyto v deionizované vodě.
  5. Sklo s gelem bylo na třepačce následně promyto 1% roztokem  $\text{HNO}_3$  (5 minut přesně) a dále opět v deionizované vodě (3 krát).
  6. Sklo s gelem bylo umístěno do misky na třepačce a zalito 0,1% roztokem  $\text{AgNO}_3$ , do kterého se těsně před použitím přidalo 3 ml formaldehydu. Tento roztok na gel působil 30 minut a následně byl ponořen do misky s deionizovanou vodou na 5 sekund.
  7. Po 5 sekundách bylo sklo s gelem zalito vychlazenou vývojkou, do které bylo těsně před použitím přidáno 2,25 ml formaldehydu a 300  $\mu\text{l}$  1% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .
  8. Po vyvinutí dostatečně zřetelných hnědočerných proužků separovaných PCR produktů bylo vyvíjení zbarvení zastaveno přilítím fix/stop roztokem.
  9. Sklo s gelem bylo přeneseno do misky s deionizovanou vodou. Po okapání skla bylo sklo přeneseno do sušárny, kde se gel při 60 °C nechal vysušit. Po vysušení bylo sklo popsáno v místech, kde nebyl gel, vyfoceno a vyhodnoceno.
  10. Sklo s nepotřebným gelem byl ponořen na několik hodin do roztoku  $\text{NaOH}$  o koncentraci 1  $\text{mol.l}^{-1}$  a následně omyto. Sklo pak bylo možné opět použít.

#### 4.4.2 Interpretace výsledků a zpracování dat

U jednotlivých vzorků byly pro každý lokus vizuálně stanoveny kostituce alel jejich číselným označením, přičemž nejnižším číslem byla označena nejpomaleji migrující alela. V případě přítomnosti pouze jedné alely u daného vzorku, byla položka hodnocena jako homozygot v daném lokusu. Po převedení výsledků do elektronické podoby (MS Excel) byly pomocí programu GenAlex 6 (Peakall *et* Smouse, 2006) pro celý studovaný soubor 88 položek *L. serriola* zjištěny hodnoty polymorfismu, očekávaná a pozorovaná heterozygotnost. Hodnoty heterozygotnosti byly stanoveny i pro jednotlivé EST-SSR

markery. Rovněž byl proveden  $\chi^2$  test (GenAlex 6) pro zjištění zda existují statisticky významné rozdíly mezi pozorovanou  $H_O$  a očekávanou heterozygotností  $H_E$ .

## 4.5 Použité roztoky

### Fix/stop roztok:

1500 ml deionizované vody

165 ml kyseliny octové

### Nanášecí pufr pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu:

0,125 g bromfenolové modře

0,125 g xylenové modře

25 ml deionizované vody

100 ml formamidu

### Polyakrylamidový 6% gel:

70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

46,5  $\mu$ l N, N, N', N'- tetramethylethylendiaminu

465  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

### Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného $\text{AgNO}_3$ :

2 g  $\text{AgNO}_3$

objem doplnit deionizovanou vodou na 2000 ml

před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

### Roztok 10% peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ :

1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

rozpustit v 10 ml deionizované vody

uchovávat v chladničce

### Roztok 1% kyseliny dusičné $\text{HNO}_3$ :

1200 ml deionizované vody

18 ml 65%  $\text{HNO}_3$

**Roztok 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu:**

1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu  
3  $\mu$ l 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu

**Roztok hydroxidu sodného NaOH 1 mol.l<sup>-1</sup>:**

40 g hydroxidu sodného  
rozpuštit v 800 ml deionizované vody  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

**TE pufr:**

10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8,0  
200  $\mu$ l zásobního roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8,0  
rozpuštit v 900 ml deionizované vody  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l a zfiltrvat

**Vývojka:**

1500 ml deionizované vody  
45 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
umístit do chladničky, aby se vychladil na teplotu nižší než 10 °C  
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu sodného Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Zásobní roztok 10x TBE pufru:**

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)  
55 g kyseliny borité H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol.l<sup>-1</sup>, pH 8,0  
rozpuštit v 800 ml deionizované vody  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

**Zásobní roztok 6% akrylamidu:**

420 g močoviny  
484 ml deionizované vody  
50 ml 10 x TBE  
150 ml zásobního 40% roztoku akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1  
po rozpuštění všech složek zfiltrvat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

## 4.6 Použité chemikálie

Agaróza (Sigma)

Akrylamid (Sigma)

Bromfenolová modř (Serva)

CTAB (Sigma)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleotid trifosfáty (Promega)

Dusičnan stříbrný (Sigma)

Ethanol – 96% roztok (Seliko Olomouc)

Ethidium bromid (Serva)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na<sub>2</sub>EDTA) (Sigma)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Sigma)

Fenol (Sigma)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (AppliChem)

Go Taq DNA polymeráza (5U.μl<sup>-1</sup>, Promega)

Hydroxid sodný (Sigma)

Chlorid sodný (Sigma)

Chloroform (Sigma)

Kyselina boritá (Sigma)

Kyselina dusičná – 65% roztok (Sigma)

Kyselina octová (Sigma)

Laurylsíran sodný (SDS) (Sigma)

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Sigma)

Močovina (Sigma)

N,N'-metylenbisakrylamid (Sigma)

N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma)

Peroxodisíran amonný (Sigma)

Rain Repellent, Clear Vue (Turtle WAX)

Thiosíran sodný (Sigma)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Sigma)

Uhličitan sodný (Sigma)

Xylenová modř (AppliChem)



## 4.7 Laboratorní přístroje

Centrifuga 5415D, Eppendorf, Germany

Cykler- XP, Bioer, China

Cyklér PTC 200, MJ Research, USA

Digestoř Merci, CZ

Digitální kamera Kodak Edas 290, Eastman Kodak, USA

Elektroforetická komůrka HF33, Hoefer, USA

Elektroforetické zdroje Minis 300 a MP-2000P, Major Science, USA

Elektroforéza T-REX, Thermo-Scientific Owl separation System, Rochester, USA

Hlubokomrazicí box Platinum 500, Angelantoni, Italy

Chladnička Liebherr, Germany

Chladítko Eppendorf, Germany

Laboratorní váhy PM 2000, Mettler-Toledo, CZ

Magnetická míchačka, Big-squid Ikamag, IKA, Germany

Mikropipeta 0,5-10 µl (osmikanálová), HTL, Poland

Mikropipety 0,3-1000 µl, Eppendorf, Germany

Mikropipety 0,3-1000 µl, ThermoScientific, USA

Mikrovlnná trouba ETA 3203, ETA, CZ

Minicentrifuga – MCF 2360, LMS, Germany

Mlýnek Mixer Mill 200, Retsch, Germany

Mraznička, Liebherr, Germany

Nanodrop ND-1000, nanodrop technologies, USA

Negatoskop – Ella NHQ1 R, Ella Legros, France

pH metr 3320, Jenway, UK

Sušárna HS62A, Chirana, CZ

Termomixér Mixing Block MB-102, Bioer, China

Termostat BT 120, Chirana, CZ

Transiluminátor UVT 20M, Herolab, Germany

Třepačka GFL, Helago, CZ

Vodní lázeň GFL 1003, Helago, CZ

Vortex – Minishaker, MS2, IKA, Germany

Výrobník deionizované vody Aqual 29 XL, Aqual, CZ

Výrobník ledu Icematic F100 Compact, Castel Mac, Italy

## 5 Výsledky

Pomocí EST-SSR markerů byla testována genetická variabilita sbírky genových zdrojů lociky kompasové (*L. serriola*). Celkem bylo testováno 16 mikrosatelitových lokusů převzatých z práce Simko (2008): SML-001, SML-002, SML-013, SML-015, SML-019, SML-020, SML-021, SML-022, SML-038, SML-039, SML-043, SML-045, SML-054, SML-055, SML-056, SML-057). Těchto 16 mikrosatelitových lokusů bylo nejdříve testováno na 4 vzorcích DNA lociky kompasové. PCR amplifikací a následnou agarózovou elektroforézou byly testovány počáteční hodnoty annealingové teploty ( $T_a$ ). Nejprve byla zvolena teplota 57 °C (Simko, 2008). Při pozitivním výsledku agarózové elektroforézy byla  $T_a$  zvýšena o 2 °C, při negativním výsledku o stejnou hodnotu snížena. Všechny PCR produkty byly dále podrobeny polyakrylamidové elektroforéze (separace probíhala 120 min), díky které bylo vybráno 5 polymorfních SSR markerů (SML-002, SML-019, SML-045, SML-055 a SML-057), na kterých bylo testováno všech 88 vzorků DNA.

Při testování bylo opět využito PCR reakce a vertikální elektroforézy. U PCR produktů byla optimalizována  $T_a$  a doba separace a také byl zjišťován počet alel. Výsledné hodnoty optimalizace a počty alel jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Výsledné hodnoty  $T_a$  (teploty annealingu), doby separace a počtů alel mikrosatelitových lokusů testovaných na jedincích lociky kompasové (*L. serriola*)

Mikrosatelitový lokus	Teplota annealingu $T_a$ (°C)	Doba separace (min)	Počet alel
SML-002	57,1	180	6
SML-019	57,1	180	2
SML-045	62,5	180	7
SML-055	61,6	180	4
SML-057	60,5	180	3

U všech 88 testovaných vzorků DNA lociky kompasové byly určeny konstituce alel u testovaných polymorfních lokusech (viz Tabulka 4).

**Tabulka 4:** Alelové kombinace 5 polymorfních mikrosatelitových lokusů u testované lociky kompasové (*L. serriola*). Tabulka zahrnuje názvy mikrosatelitových lokusů, počty alel a jejich konstituce u testovaných položek (označení vzorku DNA).

Označení položky	Mikrosatelitové lokusy a konstituce alel									
	SML-002		SML-019		SML-045		SML-055		SML-057	
14/02	3	3	1	1	4	4	3	3	1	1
15/02	3	3	2	2	2	2	3	3	1	1
16/02	6	6	1	1	3	3	1	1	1	1
18/02	6	6	2	2	4	4	3	3	1	1
20/02	6	6	1	1	3	3	3	3	1	1
26/02	6	6	2	2	3	3	3	3	1	1
28/02	6	6	1	1	3	3	1	1	1	1
29/02	6	6	1	1	3	3	3	3	1	1
32/02	6	6	2	2	3	3	1	3	1	1
34/02	6	6	2	2	3	3	1	1	1	1
35/02	6	6	2	2	3	3	3	3	1	1
36/02	6	6	2	2	3	3	3	3	1	1
38/02	6	6	2	2	4	4	3	3	1	1
39/02	6	6	2	2	3	3	3	3	1	1
40/02	6	6	1	1	2	2	1	1	1	1
42/02	6	6	1	1	3	3	3	3	1	1
43/02	6	6	2	2	2	2	3	3	1	1
47/02	6	6	1	1	2	2	1	1	1	1
49/02	6	6	2	2	4	4	3	3	1	1
50/02	6	6	2	2	2	2	3	3	1	1
52/02	6	6	1	1	3	3	3	3	1	1
53/02	6	6	1	1	4	4	1	1	1	1
54/02	5	5	2	2	5	5	1	1	1	1
55/02	6	6	2	2	7	7	1	1	1	1
56/02	3	3	2	2	5	5	1	1	1	1
59/02	6	6	2	2	3	3	1	1	1	1

**Tabulka 4:** Pokračování

Označení položky	Mikrosatelitové lokusy a konstituce alel									
	SML-002		SML-019		SML-045		SML-055		SML-057	
60/02	6	6	2	2	3	3	1	1	1	1
62/02	2	2	1	1	4	4	1	1	1	1
64/02	3	3	2	2	3	3	1	1	1	1
66/02	6	6	2	2	2	2	1	3	1	1
67/02	6	6	2	2	3	3	1	1	1	1
68/02	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
70/02	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
71/02	6	6	2	2	2	3	1	1	1	1
74/02	6	6	1	1	7	7	2	2	1	1
75/02	2	3	1	1	5	5	1	1	1	1
76/02	4	4	1	1	5	5	3	3	1	1
77/02	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
79/02	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
80/02	3	3	2	2	5	5	1	1	1	1
82/02	3	3	1	1	5	5	3	3	1	1
85/02	4	4	1	1	3	5	1	1	1	1
86/02	3	3	1	1	4	4	1	1	2	2
87/02	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
88/02	6	6	2	2	5	5	1	1	1	1
30/04	6	6	1	1	5	5	1	1	1	1
32/04	6	6	1	1	5	5	1	1	1	1
34/04	3	3	2	2	5	5	3	3	1	1
43/04	6	6	2	2	2	2	3	3	1	1
49/04	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1
53/04	3	3	2	2	5	5	1	1	1	1
58/04	6	6	1	1	3	3	1	1	1	1
63/04	6	6	1	1	5	5	1	1	1	1
70/04	6	6	2	2	3	3	1	1	1	1
73/04	6	6	1	1	3	3	1	1	1	1

**Tabulka 4:** Pokračování

Označení položky	Mikrosatelitové lokusy a konstituce alel									
	SML-002		SML-019		SML-045		SML-055		SML-057	
77/04	3	3	1	1	5	5	3	3	1	1
80/04	3	3	2	2	4	4	1	3	1	1
81/04	3	3	1	1	4	4	3	3	1	1
83/04	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
86/04	3	3	1	1	4	4	1	1	1	1
88/04	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
92/04	3	3	1	1	5	5	3	3	1	1
93/04	3	3	2	2	5	5	3	3	1	1
95/04	5	5	2	2	5	5	4	4	1	1
97/04	3	3	2	2	5	5	1	1	1	1
100/04	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
105/04	6	6	2	2	3	3	1	1	1	1
106/04	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
107/04	3	3	2	2	4	4	3	3	1	1
108/04	3	3	2	2	5	5	1	1	1	1
109/04	4	4	1	1	5	5	1	1	1	1
112/04	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
113/04	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
51/06	6	6	1	1	5	5	1	1	1	1
52/06	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
53/06	4	4	1	1	4	4	3	3	1	1
56/06	3	3	2	2	6	6	1	1	1	1
57/06	6	6	2	2	4	4	1	1	1	1
59/06	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
61/06	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
62/06	1	1	1	1	5	5	1	1	1	1
64/06	6	6	1	1	5	5	2	2	2	2
65/06	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1

**Tabulka 4:** Pokračování

Označení položky	Mikrosatelitové lokusy a konstituce alel									
	SML-002		SML-019		SML-045		SML-055		SML-057	
67/06	3	3	1	1	5	5	1	1	1	1
69/06	6	6	2	2	2	2	3	3	1	1
71/06	6	6	1	1	2	5	1	1	1	1
72/06	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
73/06	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

Testované lokusy měly od 2 do 7 alel, jejich průměrný zjištěný počet na lokus byl 4. Nejvíce polymorfními lokusy byly SML-045 (7 alel) a SML-002 (6 alel), u lokusu SML-055 byly nalezeny 3 alely a nejméně polymorfními byly lokusy SML-057 a SML-019 se dvěma alelami. U vzorků 72/06 a 73/06 byly na lokusech SML-002 a SML-019 detekovány nulové alely.

Pravděpodobně díky autogamickému způsobu rozmnožování byl pozorován velmi malý počet analyzovaných položek, které vykazovaly heterozygotní konstituci alel. Z celkových 88 vzorků byli nalezeni pouze tři heterozygoti v lokusu SML-045 (položky 71/02, 85/02, 71/06), rovněž tři heterozygotní konstituce alel byly detekovány v lokusu SML-055 (položky 32/02, 66/02, 80/04) a u položky 75/02 byla heterozygotní konstituce přítomna na lokusu SML-002. U zbývajících dvou lokusů (SML-019 a SML-057) nebyl pozorován žádný heterozygot.

**Tabulka 5:** Zjištěné charakteristiky jednotlivých mikrosatelitních markerů [\*Statisticky průkazné rozdíly mezi očekávanou a pozorovanou heterozygotností; annealingová teplota PCR ( $T_a$ ); počet nalezených alel ( $N_A$ ); pozorovaná heterozygotnost ( $H_O$ ), očekávaná heterozygotnost ( $H_E$ )]

Lokus	$T_a(^{\circ}\text{C})$	$N_A$	$H_O$	$H_E$	P-value
SML-002	57,1	6	0,012	0,599	0,000*
SML-019	57,1	2	0,000	0,493	0,000*
SML-045	62,5	7	0,034	0,708	0,000*
SML-055	61,6	4	0,034	0,467	0,000*
SML-057	60,5	2	0,000	0,044	0,000*

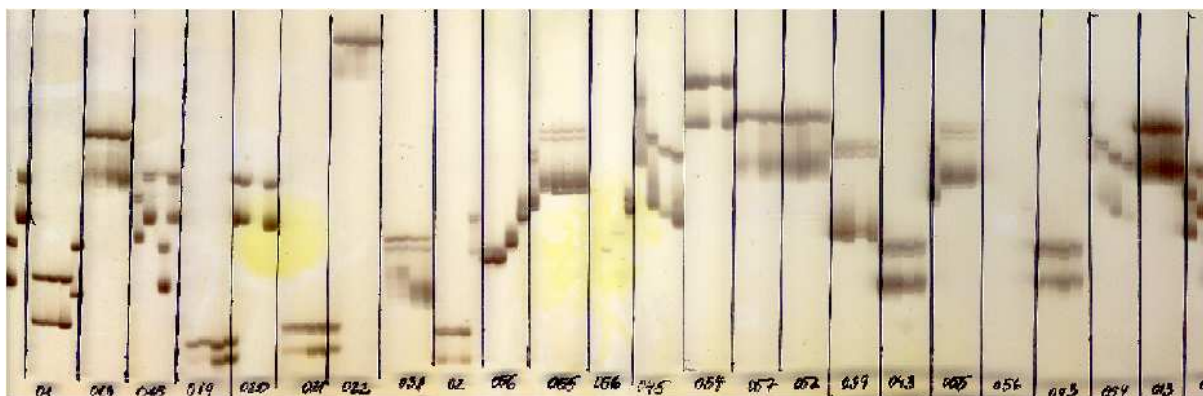
Pozorovaná heterozygotnost ( $H_O$ ) tedy byla 0,034 u SML-045 a u SML-055, 0,012 u SML-002 a u SML-019 a SML-057 byla  $H_O$  nulová (viz Tabulka 5) a pro celý soubor byla pozorovaná heterozygotnost 0,016 (viz Tabulka 6).

**Tabulka 6:** Zjištěné hodnoty indexů genetické diverzity souboru 88 položek *L. serriola* (procento polymorfních lokusů, PLP; pozorovaná heterozygotnost,  $H_O$ ; očekávaná heterozygotnost,  $H_E$ ; směrodatná odchylka, SE).

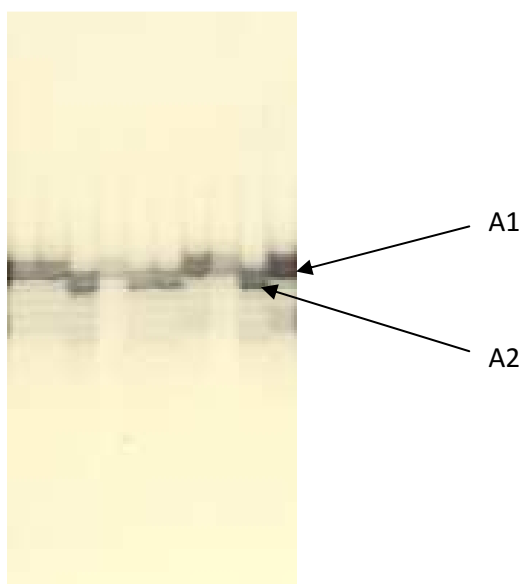
	$H_O$	$H_E$	PLP
<b>Celý soubor</b>	0,016	0,462	100%
<b>SE</b>	0,008	0,113	

U všech testovaných markerů byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi zjištěnými hodnotami pozorované heterozygotnosti ( $H_O$ ) a vypočteným hodnotám očekávané heterozygotnosti ( $H_E$ ).

**Obrázek 3:** Vizualizované PCR produkty 16 testovaných mikrosatelitových lokusů na 4 vzorcích DNA lociky kompasové. Vertikální pruhy označují jednotlivé markery



**Obrázek 4:** Příklad elektroforetogramu dvoualelového mikrosatelitového lokusu jedinců lociky kompasové (SML-019).



**Obrázek 5:** Konstituce šestialelového mikrosatelitového lokusu SML-002.





## 6 Diskuze

Praktická část bakalářské práce se zabývá výběrem vhodných mikrosatelitních markerů, které by bylo možno dále používat při studiu genetické variability položek genových zdrojů druhu *L. serriola*. Existuje řada literárních zdrojů zaměřených na geografické rozšíření, ekologii, biologii tohoto druhu včetně detailních biochemických a molekulárních studií (Doležalová *et al.*, 2002; Dziechciarková *et al.*, 2004; Kitner *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 2001; Lebeda *et al.*, 2004, 2006, 2009). Pro studium genetické variability planých progenitorů pěstovaného salátu jsou nejčastěji užívané dva systémy markerů – AFLP markery (Hill *et al.*, 1996; Koopman *et al.*, 2001; Kitner *et al.*, 2008, 2009; Lebeda *et al.*, 2009; van de Wiel *et al.*, 2010) a mikrosatelity (Witsenboer *et al.*, 1997; Van de Wiel *et al.*, 2010; Alexander *et al.*, 2009). Obecně jsou výsledky dosažené pomocí obou metod srovnatelné za předpokladu použití dostatečného počtu hodnocených AFLP bandů a mikrosatelitových lokusů (5 – 20) (Meudt *et al.*, 2007).

Cílem této bakalářské práce byl výběr pěti polymorfních mikrosatelitových markerů (EST-SSR) z práce Simko (2008). Získané výsledky budou proto dále konfrontovány s daty publikovanými v publikaci Simko (2008) a zároveň srovnávány s daty v publikacích zabývajících se genetickou variabilitou přírodních populací a genových sbírek rodu *Lactuca*.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) popsaná v původní práci (Simko, 2008) probíhala v celkovém objemu vzorku 10  $\mu\text{l}$ , za použití GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI) a forward a reverse primery v koncentraci 0,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Teplota annealingu byla zvolena na 57 °C na 30 s. Nejvyšší očekávaná heterozygotnost byla pozorována u SML-002 (0,91). Zjištěné hodnoty průměrné heterozygotnosti a počtu alel na lokus u EST-SSR markerů ( $H_E = 0,32$ ;  $N_A = 3,56$ ) byly statisticky průkazně nižší ve srovnání s anonymními SSR ( $H_E = 0,59$ ;  $N_A = 5,53$ ) (Simko, 2008). Tyto rozdíly mezi anonymními a EST mikrosatelity byly pozorovány i u rýže (Cho *et al.*, 2000), vinné révy (Scott *et al.*, 2000), pšenice (Eujayl *et al.*, 2002) a slunečnice (Pashley *et al.*, 2006) a jsou vysvětlovány konzervativní povahou kódujících oblastí, ze kterých jsou EST-SSR vyvíjeny.

Při srovnání převoditelnosti anonymních a EST-SSR markerů odozených pro kultivary pěstovaného salátu na plané druhy (*cross-species* PCR amplifikace) bylo zjištěno, že oba typy markerů jsou na plané typy převoditelné, ale úroveň převoditelnosti markerů klesá s úrovní sexuální kompatibility daného druhu s *L. sativa* (Simko, 2008). Zjištěná použitelnost *cross-species* PCR amplifikace byla zjištěna při použití EST-SSR markerů (100 % *L. serriola*, 87 % *L. saligna*, a 75 % *L. virosa*) ve srovnání s anonymními SSR (93 % *L. serriola*,

66 % *L. saligna* a 42 % *L. virosa*). Podobná souvislost byla pozorována i u jiných rostlin – např. *Pinus* (Chagne *et al.*, 2004), *Medicago* (Gutierrez *et al.*, 2005) a *Helianthus* (Pashley *et al.*, 2006).

Pro provedení polymerázové řetězcové reakce (PCR) v této bakalářské práci byla použita GoTaq DNA polymeráza od stejného výrobce jako polymeráza použitá v práci Simko (2008) a reakce probíhala v celkovém objemu 15  $\mu$ l. Koncentrace primerů byla 10  $\mu$ mol.l<sup>-1</sup>. Annealingovou teplotu ( $T_a$ ) bylo nutno optimalizovat pro každý marker zvlášť. Její hodnoty se pohybovaly v rozpětí od 57,1 °C do 62,5 °C.

Výsledky týkající se počtu alel se výrazně nelišily od výsledků Simka (2008). Hodnoty zjištěné v této bakalářské práci se u jednotlivých lokusů pohybovaly v rozmezí od 2 do 7 (2 alely u SML-019, SML-057, 3 alely u SML-055, 6 alel u SML-002 a 7 alel u SML-045). Průměrný počet alel na lokus byl tedy 4. U stejných mikrosatelitových lokusů byly v původní práci (Simko, 2008) zjištěné počty alel následující: 7 alel u SML-002, 3 alely u SML-019, 8 alel u SML-045, 4 alely u SML-055 a 3 alely SML-057. U mikrosatelitových lokusů SML-002, SML-019, SML-045 a SML-057 bylo tedy nalezeno vždy o jednu alelu více než bylo zjištěno v rámci této bakalářské práce. U mikrosatelitového lokusu SML-055 byl dokonce počet alel totožný.

Větší rozdíly však už byly pozorovány u hodnot očekávané heterozygotnosti u jednotlivých lokusů. Výsledné hodnoty očekávané heterozygotnosti Simka (2008) byly: lokus SML-002 (0,91), SML-019 (0,49), SML-045 (0,70), SML-055 (0,64) a SML-057 (0,60). V této práci byly zjištěné hodnoty  $H_E$ : 0,599 pro lokus SML-002, 0,493 pro SML-019, 0,708 pro SML-045, 0,467 pro SML,055 a 0,044 pro SML-057). Vyšší rozdíly jsou tedy mezi hodnotami  $H_E$  u mikrosatelitových lokusů SML-002, SML-055 a SML-057 s tím, že vyšší hodnota byla pozorována v práci Simka (2008). Průměrné hodnoty očekávané heterozygotnosti byly naopak ve studii Simka nižší ( $H_E = 0,320$ ) ve srovnání s hodnotami uváděnými v této bakalářské práci ( $H_E = 0,462$ ). Simko (2008) udává nejnižší hodnoty  $H_E$  morfortypů Iceberg (0,097), Latin (0,140) a Romaine (0,151), zatímco nejvyšší u morfortypů Leaf Green (0,208) a Leaf Red (0,240).

U studovaného souboru položek *L. serriola* byla zjištěna velmi nízká pozorovaná heterozygotnost ( $H_O$ ). Nejvyšší pozorovaná heterozygotnost byla zjištěna 0,034 u lokusu SML-045 a SML-055, průměrná  $H_O$  celého souboru byla 0,012.

Zjištěné hodnoty očekávané heterozygotnosti  $H_E$  analyzovaného souboru vzorků, pocházejícího z území USA a Kanady, jsou o něco vyšší než hodnoty  $H_E$  publikované například v práci Van de Wiel *et al.* (2010) využívající rovněž mikrosatelitní markery. Populace *L. serriola* studované v této práci pochází z území Velké Británie, Nizozemí, Německa a České republiky a hodnoty  $H_E$  byly 0,320. Zjištěné nízké hodnoty pozorované heterozygotnosti odpovídají autogamní povaze studovaného druhu.

Identická sada položek *L. serriola* byla analyzována pomocí metody AFLP v diplomové práci Šmachové (2010). Zjištěná hodnota očekávané heterozygotnosti na základě AFLP dat byla nižší ( $H_E = 0,268$ ) ve srovnání s hodnotou získanou pomocí EST-SSR markerů ( $H_E = 0,462$ ). Rozdíly mezi výsledky obou metod lze spatřovat právě v povaze obou markerů (kodominantní - dominantní charakter), počtu analyzovaných EST-SSR lokusů a způsobu výpočtu hodnot heterozygotnosti z AFLP dat. Výpočet se provádí na základě frekvence dominantní alely (tedy přítomnost AFLP bandu) nepřímo podle Hardy-Weinbergova zákona ( $H_E = 2pq$ ). Za recesivní alelu je považována nepřítomnost daného bandu (Ehrich, 2006). V dalších pracích využívající AFLP markery pro studium genetické variability přírodních populací *L. serriola* byly rovněž zjištěny nízké hodnoty očekávané heterozygotnosti ( $H_E$ ): 0,050 (Van de Wiel *et al.*, 2010); 0,087 (Lebeda *et al.*, 2009).

Srovnáním výsledků genetické variability populací *L. serriola*, které byly zjištěny pomocí různých typů molekulárních metod lze konstatovat, že hodnoty genetické variability detekované pomocí mikrosatelitních markerů jsou celkově vyšší ve srovnání s hodnotami zjištěnými pomocí jiných metod – např. pomocí AFLP.

Je nutné zmínit fakt, že zjištěné hodnoty indexů genetické variability analyzovaného souboru v této bakalářské práci jsou pouze předběžné. Byly zjištěny pouze na podsouboru položek poměrně rozsáhlé pracovní kolekce genových zdrojů *L. serriola* udržované na Katedře botaniky PřF UP. Primárním cílem této bakalářské práce byl výběr vhodných EST-SSR markerů, optimalizace PCR a doby separace PCR produktů, právě pro aplikaci na celou genofondovou kolekci v navazujících studiích.

## 7 Závěr

*Lactuca serriola* L. je nejrozšířenějším druhem rodu *Lactuca* L. Jednou z jeho základních charakteristik je ekologická, morfologická a genetická variabilita. Osídluje různé typy stanovišť. Jedná se o invazivní druh, který se intenzivně šíří. Jeho úzká příbuznost s pěstovaným salátem (*L. sativa*) a široká variabilita poskytuje mnoho možností k využití druhu *L. serriola* ve šlechtění *L. sativa*, zvláště ve zdokonalování nových odrůd a přizpůsobení se nárokům spotřebitelů.

Tématem této bakalářské práce je detekce genetické variability sbírky genových zdrojů *Lactuca serriola* pomocí SSR markerů. Jejím cílem bylo nalezení tří až pěti polymorfních mikrosatelitových lokusů a jejich aplikace na 88 položek lociky kompasové (*Lactuca serriola*). Za tímto účelem byly použity základní laboratorní techniky: izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR) a její optimalizace, agarózová a polyakrylamidová elektroforéza. DNA byla izolována z rostlin pocházejících ze Severní Ameriky a pěstovaných ve skleníku Katedry botaniky PřF UP v Olomouci.

Testováním celkových 16 párů primerů bylo vybráno 5 mikrosatelitových lokusů, které byly aplikovány na testované položky *L. serriola*. Počty alel jednotlivých lokusů se pohybovaly od 2 do 7 (2 alely u SML-019, SML-057, 3 alely u SML-055, 6 alel u SML-002 a 7 alel u SML-045). Průměrný počet alel na lokus byl tedy 4.

Dále byly určeny jednotlivé genotypy mikrosatelitových lokusů u jednotlivých položek *L. serriola* a vypočítány indexy genetické variability pro jednotlivé lokusy a celý analyzovaný soubor položek *L. serriola*. Úroveň hodnot indexů genetické diverzity je nízká, koresponduje s doposud publikovanými údaji v literatuře a odpovídá autogamní povaze studovaného druhu

Poznatky získané v průběhu této bakalářské práce budou využity v probíhajícím výzkumu variability genových zdrojů a přírodních populací *L. serriola*, který probíhá na Katedře botaniky PřF UP.

## 8 Seznam použitých zkratek

AFLP	Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
dATP	deoxyriboadenozin trifosfát
dCTP	deoxyribocytidin trifosfát
dGTP	deoxyriboguanidin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosáty
dTTP	deoxyribotymidin trifosfát
EST	místo s expresní adresou ( <i>Expressed Sequence Tag</i> )
H <sub>O</sub>	Pozorovaná heterozygotnost ( <i>Heterozygosity Observed</i> )
LINE	dlouhá rozptýlená repetice ( <i>Long Interspersed Element</i> )
NBS	<i>Nucleotide-Binding Site</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RAPD	Náhodná amplifikovaná polymorfni DNA ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )
SINE	krátká rozptýlená repetice ( <i>Short Interspersed Element</i> )
SRAP	<i>Sequence-Related Amplified Polymorphism</i>
SSAP	<i>Sequence-Specific Amplified Polymorphism</i>
SSR	repetice jednoduchých sekvencí ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
TRAP	<i>Target Region Amplification Polymorphism</i>
VNTR	variabilní počet tandemových repeticí ( <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> )

## 9 Seznam použité literatury

- Alexander JM, Poll M, Hansjorg D, Edwards PJ (2009): Contrasting patterns of genetic variation and structure in plant invasions of mountains. *Diversity and Distributions* 15, 502 – 515.
- Amor RL (1986): Incidence and growth of prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) in dryland crops in the Victorian Wimmera. *Plant Prot. Q.*1, 148 – 151.
- Angers B, Bernatchez L (1997): Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Mol Biol Evol.* 14, 230 – 238.
- Angers B, Estoup A, Jarne P (2000): Microsatellite Size Homoplasmy, SSCP, and Population Structure: A Case Study in the Freshwater Snail *Bulinus truncatus*. *Molecular Biology and Evolution*, 1926 – 1932.
- Ayad WG, Hodgkin T, Jaradat A, Rao VR (Eds.) (1997): Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources, in Report IPGRI Workshop, 9 – 11 October 1995 Rome IPGRI, Rome, Italy.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80 – 83.
- Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL (1982): Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* 126, 374 – 380.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93 – 99.
- Brant V, Holec J (2004): Locika kompasová (*Lactuca serriola* L.). *Rostlinolékař* 15/5, 24 – 27.
- Bremer K, Anderberg AA, Karis PO, Nordenstam B, Lundberg J, Ryding O (1994): *Asteraceae: Cladistic and Classification*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Burbinge NT, Gray M (1970): *Flora of the Australian Capital Territory*. Australian National University Press, Canberra.
- Campbell NA, Reece JB (2006): *Biologie*, 1. vydání. Computer Press, Brno.
- Carter RE (2000): DNA Fingerprinting using Minisatellite Probes. In: Baker AJ (Ed.): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Oxford.
- Comincini S, Leone P, Redaelli L, DeGiuli L, Zhang Y, Ferretti L (1995): Characterization of bovine microsaellites by silver staining. *J. Anim. Breed. Genet.* 112, 415 – 420.

- Creste S, Tulmann N, Figueira A (2001): Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 299 – 306.
- Dakin EE, Avise JC (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 504 – 509.
- Doležalová I, Křístková E, Lebeda A, Vinter V (2002). Description of morphological characters of wild *Lactuca* L. spp. genetic resources (English – Czech Version). *Horticulture science* 29, 56 – 83.
- Doležalová I, Lebeda A, Křístková E (2001): Prickly lettuce (*L. serriola* L.) germplasm collecting and distribution study in Slovenia and Sweden. *Plant Genet. Res. Newsl.* 128, 41 – 44.
- Dziechciarková M, Lebeda A, Doležalová I, Astley D (2004): Characterization of *Lactuca* spp. germplasm by protein and molecular markers – a review. *Plant Soil Environmental* 50, 47 – 58.
- Ehrich D (2006): AFLP data collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Mol. Ecol. Notes* 6, 603 – 604.
- Ellis JR, Burke JM (2007): EST-SSRs as a resource for population genetic analyses - short review. *Heredity* 99, 125 – 132.
- Estoup A, Jarne P, Cournet J-M (2002): Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P, Powell W. 2002. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104, 399 – 407.
- Feráková V (1977): The genus *Lactuca* L. in Europe. Komenský University Press, Bratislava (Czechoslovakia).
- Gemeinholzer B, Kilian N (2005): Phylogeny and subtribal delimitation of the *Cichorieae* (*Asteraceae*), in XVII International Botanical Congress, Vienna, Austria, 17 – 23 July 2005. Abstracts, 103, Abstract 6.11.4.
- Gutierrez MV, Vaz Patta MC, Huguet T, Cubero JI, Moreno MT, Torres AM. 2005. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theor. Appl. Genet.* 110, 1210 – 1217.

- Herring AJ, English NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD (1982): Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiology* 16, 473 – 477.
- Heywood VH (1978): *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, Oxford.
- Hill M, Witsenboer H, Zabeau M, Vos P, Kesseli R, Michelmore R (1996): PCR-based fingerprinting using AFLPs as tool for studying genetic relationship in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1202 – 1210.
- Hooftman DAP, Oostermeijer JGB, den Nijs JCM (2006a): Invasive behaviour of *Lactuca serriola* (Asteraceae) in the Netherlands: Spatial distribution and ecological amplitude. *Basic and Applied Ecology* 7, 507 – 519.
- Hu J, Vick BA (2003): Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter* 21, 289 – 294.
- Chagne D, Chaumeil P, Ramboer A, Collada C, Guevara A, Cervera MT, Vendramin GG, Garcia V, Frigerio JM, Echt C, et al. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1204 – 1214.
- Chapman MA, Chang JCh, Weisman D, Kesseli RV, Burke JM (2007): Universal markers for comparative mapping and phylogenetic analysis in the *Asteraceae* (*Compositae*). *Theor Appl Genet.* 115, 747 – 755.
- Chapuis M-P, Estoup A (2006): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621 – 631.
- Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N, Cartinhour S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100, 713 – 722.
- Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF (1999): Comparison of three methods of microsatellite detection. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59, 167 – 178.
- Jansen J, Verbakel H, Peleman J, van Hintum ThJL (2006): A note on the measurement of genetic diversity within genebank accessions of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 112, 554 – 561.
- Jeffrey C (1995): *Compositae systematics 1975 – 1993. Developments and desiderata*. In: Hind DJN, Jeffrey C, Pope GV (Eds.), *Advances in Compositae Systematics*. Kew, Royal Botanic Gardens, 3 – 21.
- Jones AG, Ardren WR (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511 – 2523.



- Jones N, Ougham H, Thomas H, Pašakinskienė I (2009): Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183, 935 – 966.
- Kesseli RV, Michelmore RW (1986): Genetic variation and phylogenetics detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. *J. Heredity* 77, 324 – 331.
- Kesseli RV, Ochoa O, Michelmore RW (1991): Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce. *Genome* 34, 430 – 436.
- Kesseli RV, Paran I, Michelmore RW (1994): Analysis of a detailed genetic map of *Lactuca sativa* constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics* 136, 1435 – 1446.
- Kitner M, Lebeda A, Doležalová I, Maras M, Křístková E, Nevo E, Pavlíček T, Meglic V, Beharav A (2008): AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries. *Israel J. Plant Sci.* 56, 185 – 193.
- Kitner M, Maras M, Lebeda A, Meglic V, Šmachová P, Novotná A, Doležalová I (2009): Genetic diversity analysis of wild *Lactuca serriola* germplasm collection from North America assessed by AFLP. In: Goličnik, M., Bavec, A. (Eds.): Joint Congress of The Slovenian Biochemical Society and The Genetic Society of Slovenia with International Participation; Otočec, September 20 – 23, 2009; Book of Abstracts, p. 175. Published by Slovenian Biochemical Society and Genetic Society of Slovenia, Printed by Ulčakar & JK, Ljubljana (ISBN 978-961-91651-5-7).
- Koopman WJM, Zevenbergen MJ, Van den Berg RG (2001): Species relationships in *Lactuca* S. L. (*Lactuceae*, *Asteraceae*) inferred from AFLP fingerprints. *Amer. J. Bot.* 88, 1881 – 1887.
- Kuang H, van Eck HJ, Sicard D, Michelmore R, Nevo E (2008): Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its *RGC2* resistance gene cluster. *Genetics* 178, 1547 – 1558.
- Kuang H, Woo S-S, Meyers BC, Nevo E, Michelmore RW (2004): Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *Plant Cell* 16, 2870 – 2894.
- Kump B, Javornik B (1996): Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Sci.* 114, 149 – 158.
- Lebeda A (1998): Biodiversity of the interactions between germplasms of wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). Report on research programme OECD Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems. HRI Wellesbourne, UK.

- Lebeda A, Doležalová I, Křístková E, Mieslerová B (2001): Biodiversity and ecogeography of wild *Lactuca* spp. in some European countries. *Genet. Res. Crop Evol.* 48, 153 – 164.
- Lebeda A, Doležalová I, Feráková V, Astley D (2004): Geographical distribution of wild *Lactuca* species (*Asteraceae*, *Lactuceae*). *Bot. Rev.* 70, 328 – 356.
- Lebeda A, Sedlářová M, Lynn J, Pink DAC (2006): Phenotypic and histological expression of different genetic backgrounds in interactions between lettuce, wild *Lactuca* spp., *L. sativa* × *L. serriola* hybrids and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 115, 431 – 441.
- Lebeda A, Ryder EJ, Grube R, Doležalová I, Křístková E (2007): Lettuce (*Asteraceae*; *Lactuca* spp.), Chapter 9, pp. 377 – 472. – In Singh, R (ed.): Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series, Volume 3 – Vegetable crops. CRC Press, Boca raton, FL, USA.
- Lebeda A, Kitner M, Dziechciarková M, Doležalová I, Křístková E, Lindhout P (2009): An insight into the genetic polymorphism among European populations of *Lactuca serriola* assessed by AFLP. *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 597 – 608.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH (1981): Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437 – 1438.
- Meudt M, Clarke AC (2007): Almost Forgotten or Latest Practice: AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12(3), 106 – 117.
- Novotná A, Doležalová A, Lebeda A, Kršková M, Berka T (2011): Morphological variability of achenes of some European populations of *Lactuca serriola* L. *Flora* 206, 473 – 483.
- Okubara PA, Arroyo-Garcia R, Shen KA, Mezier M, Meyers BC, Ochoa OE, Kim S, Yang Ch, Michelmore RW (1997): A transgenic mutant of *Lactuca sativa* (lettuce) with a T-DNA tightly linked to loss of downy mildew resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 970 – 977.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Carneiro Vieira ML (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294 – 307.
- Pashley CH, Ellis JR, McCauley DE, Burke JM (2006): EST databases as a source for molecular markers: Lessons from *Helianthus*. *Journal of Heredity* 97, 381 – 388.
- Peakall R, Smouse PE (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6, 288 – 295.

- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H (1996): A wide-range survey of *cross-species* microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5, 365 – 378.
- Prince DS, Carter RN (1977): Prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) in Britain. *Watsonia* 11, 331 – 338.
- Riar DS, Rustgi S, Burke IC, Gill KS, Yenish JP (2011): EST-SSR Development from 5 *Lactuca* species and their use in studying genetic diversity among *L. Serriola* biotypes. *Journal of Heredity* 102, 17 – 28.
- Scott KD, Egger P, Seaton G, Rossetto M, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2000): Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 100, 723 – 726.
- Shen KA, Chin DB, Arroyo-Garcia R, Ochoa OE, Lavelle DO, Wroblewski T, Meyers BC, Michelmore RW (2002): Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site – Leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular plant – microbe interactions* 15, 251 – 261.
- Sicard D, Woo SS, Arroyo-Garcia R, Ochoa O, Nguyen D, Korol A, Nevo E, Michelmore RW (1999): Molecular diversity at the major cluster of disease resistance genes in cultivated and wild *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 405 – 418.
- Simko I (2008): Development of EST-SSR markers for the study of population structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity* 100, 256 – 262.
- Slavík B, Štěpánková J, Bělohávková R, Bureš P, Danihelka J, Dvořáková M, Grulich V, Hřčka D, Hroudá L, Chrtěk J Jun., Kaplan Z, Kirschner J, Kirschnerová L, Kochjaková J, Koutecký P, Kovanda M, Křísa B, Kubát K, Skalická A, Slavíková Z, Sutorý K, Šída O, Štech M, Štěpánek J, Zelený V (2004): *Květena České republiky* 7. Academia, Praha.
- Snustad DP, Simmons MJ (2009): *Genetika*, 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno.
- Sommerville LL, Wang K (1981): The ultrasensitive silver protein stain also detects nanograms of nucleic acids. *Biochem. Biophys. Rec. Commun.* 102, 530 – 548.
- Spooner DM, van Treuren RR, de Vicente MC (2005): Molecular markers for germplasm and genebank management. *Technical Bulletin* 10, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Šmachová P (2010): Využití proteinových a molekulárních markerů pro charakterizaci variability genových zdrojů rodu *Lactuca*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V (2005): *Metody molekulární biologie*. Vydavatelství MU, Brno.

- Tomb AS (1977): *Lactuceae* – systematic review. In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL: The Biology and Chemistry of the *Compositae* 2. Academic Press, London, UK.
- Van de Wiel C, Arens P, Vosman B (1999): Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome* 42, 139 – 149.
- Van de Wiel CCM, Sretenović Rajičić T, Van Treuren R, Dehner KJ, Van der Linden CG, Van Hintum TJJ (2010): Distribution of genetic diversity in wild European populations of prickly lettuce (*Lactuca serriola*): implications for plant genetic resources management. *Plant Genetics resources - Characterization and Utilization* 8, 1 – 11.
- Van Treuren R, van Hintum TJJ (2009): Comparison of anonymous and targeted molecular markers for the estimation of genetic diversity in *ex situ* conserved *Lactuca*. *Theor. Appl. Genet.* 119, 1265 – 1279.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005): Genic microsatellite markers in plants: features and applications – review. *TRENDS in Biotechnology* 23, 48 – 55.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 23, 4407 – 4414.
- Walsh SP, Fildes NJ, Reynolds R (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acid Research* 24, 2807 – 2812.
- Waycott W, Fort SB (1994): Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphological analyses. *Genome* 85, 239 – 244.
- Webb CJ, Sykes WR, Garnock-Jones PJ (1988): *Flora of New Zealand*. Vol. IV. Botany Division, D.S.I.R., Christchurch.
- Weising K, Nybom H, Wolff KK, Kahl G (2005): *DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications*, 2. Edition. CRC Press, Boca Raton.
- Witsenboer H, Vogel J, Michelmore RW (1997): Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp). *Genome* 40, 923 – 936.
- Woodland DW (2009): *Contemporary plant systematics*, 4. Edition. Andrews University Press.
- Wroblewski T, Piskurewicz U, Tomczak A, Ochoa O, Michelmore RW (2007): Silencing of the major family of NBS-LRR encoding genes in lettuce results in the loss of multiple resistance specificities. *Plant J.* 51, 803 – 818.

- Zane L, Bargelloni L, Paternello T (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1 – 16.
- Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J (2004): *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Zohary D (1991): The wild genetic resources of cultivated lettuce (*L. sativa* L.). *Euphytica* 53, 31 – 35.