

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BOTANIKY



**Využití vybraných regionů jaderné
a chloroplastové DNA ke studiu fylogeneze
vybraných zástupců rodu *Lactuca***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Denisa Plucnarová

Studijní obor: Botanika

Forma studia: Prezenční

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

Konzultant: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Olomouc 2018

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem zpracovala samostatně v průběhu magisterského studia. Veškerou literaturu, z níž jsem čerpala, v práci cituji a je uvedena v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Denisa Plucnarová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Luboši Majeskému, Ph.D. z Katedry botaniky Přf UP za nesmírně cenné rady, věnovaný čas, při zpracování této práce, kritické připomínky a velkou vstřícnost. Také bych mu ráda poděkovala za odborný dohled při zpracování výsledků. V neposlední řadě bych ráda poděkovala RNDr. Miloslavu Kitnerovi, Ph.D a prof. Ing. Aleši Lebedovi, DrSc. za poskytnutí vzorků genomické DNA, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Denisa Plucnarová
Název práce:	Využití vybraných regionů jaderné a chloroplastové DNA ke studiu fylogeneze vybraných zástupců rodu <i>Lactuca</i>
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci, Česká republika
Vedoucí práce:	Vedoucí práce: RNDr. Ľuboš Majeský, Ph.D.
Konzultant:	Konzultant: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017

Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit použitelnost vybraných molekulárních markerů k rekonstrukci fylogeneze rodu *Lactuca* a mezidruhových vztahů mezi vybranými druhy rodu. Pro tento cíl byly zvoleny tři lokusy: jaderný úsek ITS a dva chloroplastové úseky *trnL – trnF* a *ndhF*. Vhodnost vybraných markerů k rekonstrukci fylogeneze na nízké taxonomické úrovni byla testována prostřednictvím dvou metod: maximální úspornosti a maximální věrohodnosti. Topologie získaných stromů byla velice podobná napříč hodnocenými markery a také použitými metodami. Na všech zkonstruovaných stromech se vyčlenilo několik monofyletických skupin: "*Lactuca* sensu lato", skupina asijských taxonů, "afro-americká" skupina, skupina taxonů *perennis/undulata* a *sororia/triangularata*. Skupina "*Lactuca* sensu lato" byla tvořena dvěma příbuznými, dobře odlišenými skupinami "*Lactuca* sensu stricto" a "*Scariola*". Vnitřní mezidruhové vztahy v rámci těchto hlavních skupin zůstaly částečně nevyřešené. Nevyřešené zůstaly také fylogenetické vztahy mezi hlavními skupinami. Z práce lze zhodnotit, že použité lokusy jsou dostatečné k vyčlenění hlavních evolučních linií v rámci subtribu *Lactucinae*, avšak nejsou dostatečné na to, aby dokázaly rozřešit vnitřní vztahy mezi jednotlivými taxony a mezi jednotlivými liniemi.

Klíčová slova: DNA, fylogenetické stromy, *Lactuca*, maximální věrohodnosti, maximální úspornosti, PCR, primer

Počet stran/počet příloh: 46/6

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Denisa Plucnarová

Title: Utilization of selected nuclear and chloroplast DNA markers in the study of phylogeny of selected taxa from the genus *Lactuca*

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc,

Supervisor: RNDr. Ľuboš Majeský, Ph.D.

Consultant: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

The year of defense: 2017

Abstract

The aim of this master thesis was to evaluate the suitability of selected molecular markers for reconstruction of the phylogeny of the genus *Lactuca* and to resolve interspecific relationships among selected species of the genus. For this purpose three loci were selected: nuclear locus ITS, and two chloroplast loci trnL – trnF and ndhF. Suitability of the selected markers for reconstruction of phylogeny on the low taxonomic level was tested using two main methods, Maximum parsimony, and Maximum Likelihood. The topology of inferred trees was very similar across all of the tested loci and methods. On all of the inferred trees, several monophyletic groups were consistently present. Namely, the group "*Lactuca sensu lato*"; group of "Afro-American" taxa, group of "Asian" taxa, *perennis/undulata* clade, and *sororia/triangulata* clade. The "*Lactuca sensu lato*" group consist of two related and clearly separated subgroups, "*Lactuca sensu stricto*" and "*Scariola*". Within the inferred groups, the interspecific relationships remained partially unresolved as well as the relationships between the inferred main groups. The results showed that used molecular markers are sufficient for recognition of wider groups/lineages within the subtribe *Lactucinae*, however, are not sufficient enough for resolving internal relationships within the wider groups and between the main lineages.

Keywords: DNA, *Lactuca*, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, PCR, phylogenetic tree, primer,

Number of pages/appendices: 46/6

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1	Charakteristika a morfologický popis rodu locika (<i>Lactuca</i>).....	11
2.1.1	Geografické rozšíření rodu.....	11
2.1.2	Taxonomie rodu	12
2.2	Molekulární metody používány ve studii fylogeneze rodu <i>Lactuca</i>	15
3	MATERIÁL A METODY	20
3.1	Rostlinný materiál	20
3.2	Izolace DNA.....	22
3.2.1	Měření koncentrace a stanovení míry integrity vyizolované DNA	22
3.3	Amplifikace vybraných oblastí cp a nrDNA pomocí PCR	22
3.4	Pročištění vzorků před sekvenací	24
3.5	Zpracování sekvencí a fylogenetické analýzy.....	25
4	VÝSLEDKY	27
5	DISKUZE	34
6	ZÁVĚR	38
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	45
7	PŘÍLOHY	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam použitých rostlin, jejich původ a počet jedinců z každého druhu...20
Tabulka 2 Složení reakční směsi pro PCR reakce23
Tabulka 3 Program pro PCR reakci pro testované lokusy.....23
Tabulka 4 Testované DNA markery25
Tabulka 5 Vybrané modely u metody maximální věrohodnosti, použité v setu A a v setu B u jednotlivých lokusů k rekonstrukci fylogeneze26
Tabulka 6 Charakteristika parsimonických analýz a použitých aligmentů27

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Fylogenetické stromy vytvořené z jaderného úseku ITS 30
Obrázek 2 Fylogenetické stromy vytvořené z chloroplastového úseku ndhF..31
Obrázek 3 Fylogenetické stromy vytvořené z chloroplastového úseku trnL – trnF.....32
Obrázek 4 Fylogenetické stromy vytvořené ze spojených chloroplastových úseků trnL – trnF a ndhF..33

SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 7 Seznam haplotypů pro lokus trnL – trnF46
Tabulka 8 Seznam haplotypů pro lokus ndhF47
Tabulka 9 Seznam ribotypů pro lokus ITS48
Tabulka 10 Seznam vzorků stažených z databáze GenBank49
Seznam 1 Použité přístroje a laboratorní vybavení51
Seznam 2 Použité chemikálie a roztoky52
Obrázek 5 Fylogenetický strom setu B vytvořený z chloroplastového úseku trnL – trnF metodou maximální věrohodnosti
Obrázek 6 Fylogenetický strom setu B vytvořený z jaderného úseku ITS metodou maximální úspornosti

1 ÚVOD

Rod *Lactuca* L. patří do jedné z největších a evolučně nejúspěšnějších rostlinných čeledí Asteraceae. Do daného rodu se řadí jeden kulturní druh *L. sativa* L., který má mnoho variet či kultivarů různých barev a tvarů listů, má také hospodářský význam a pěstuje se jako listová zelenina. Mnoho planě rostoucích druhů se vyskytuje po celém světě a to zejména v Evropě, Asii, Severní a Střední Americe a Africe a Australii (Lebeda et al., 2007). Biogeograficky jsou dobře zpracované evropské druhy. Komplexní údaje o ekologii a geografickém rozšíření afrických, asijských a severoamerických druhů rodu *Lactuca* však chybí (Lebeda et al., 2004).

Rod *Lactuca* byl zpracován v mnoha studiích, ale chybí podstatné informace o fylogenetickém uspořádání rodu. Dosavadní analýzy zpracovávaly jen velmi omezený počet druhů z rodu (např. Koopman et al., 1998; Wang et al., 2013; Wei et al., 2017), ale větší a ucelenější studie, která by zpracovávala větší a více reprezentativnější vzorek druhů řadících se do rodu *Lactuca*, chybí. Evoluční vztahy mezi jednotlivými zástupci rodu nejsou zcela jasné a molekulární studie poukazují na to, že v průběhu evoluce subtribu *Lactucinae* pravděpodobně docházelo k opakované hybridizaci, což se odrazilo zejména v dědičnosti a variabilitě chloroplastových markerů. Tato skutečnost komplikuje rekonstrukci fylogeneze na nižší taxonomické úrovni.

Při šlechtění hospodářsky významného druhu *L. sativa* se využívaly jeho příbuzné planě rostoucí druhy. V současné době jsou publikované studie, týkající se pěstovaného salátu a jeho příbuzných druhů, které tvoří tzv. primární genový pool *L. sativa* (Lebeda et al., 2014). Geny z genového poolu lze použít ke zvýšení kvality vlastností u šlechtěných rostlin a pro zachování nebo rozšíření druhové diverzity (Lebeda et al., 2007). Celkem jsou tři skupiny genových poolů, které byly sestavené na základě křížení mezi šlechtěnými a jejich příbuznými druhy (Harlan & Wet, 1971). První skupina představuje primární genový pool a zahrnuje druhy *L. altaica* Fisch. & C.A.Mey., *L. aculeata* Boiss., *L. serriola* L., *L. dregeana* DC. a *L. azerbaijanica* Rech.f., *L. georgica* Grossh., *L. scarioloides* Boiss., které se mohou lehce křížit, snadno vyměňovat geny a jsou kompatibilní s *L. sativa*. Druhá skupina je sekundární genový pool a zahrnuje planě rostoucí druh *L. saligna* L. Třetí skupina tvoří terciální genový pool a zahrnuje druh *L. virosa* L., u kterého je výměna genů obtížná a musí se jim pomáhat speciálními metodami (Lebeda et al., 2007). Druhy, které se mohou přirozeně křížit s kulturním salátem, mohou být snáze využity pro zlepšení

jeho důležitých vlastností a genetické variability (Lebeda et al., 2014). Poznání fylogenetických vztahů uvnitř rodu *Lactuca* a identifikace blízkých příbuzných taxonů je velice důležitá a může pomoci ve šlechtění.

Cíle práce

Cílem této diplomové práce je pomocí metod molekulární biologie a fylogenetické analýzy zhodnotit vhodnost (informační hodnotu) vybraných jaderných a chloroplastových molekulárních markerů k rekonstrukci mezidruhových vztahů na rozšířeném datasetu rodu *Lactuca*, který obsahuje zástupce téměř všech hlavních skupin rozlišovaných v rodě. Následně kriticky zhodnotit získané výsledky v širším kontextu rodu *Lactuca* i z nomenklatorického hlediska.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristika a morfologický popis rodu locika (*Lactuca*)

Název rodu *Lactuca* pochází od latinského slova „laceo“, což v překladu znamená „mít mléko“. Zástupci rodu mají v pletivech specializované buňky, tzv. mléčice, které obsahují mléčnou šťávu, tzv. latex (Ferráková, 1977; Lebeda & Pink, 1998). Latex je směsí fenolů, proteinů, terpenoidů, alkaloidů a glykosidů (Lebeda et al., 2013).

Rod *Lactuca* zahrnuje jednoleté, dvouleté i vytrvalé byliny (Grulich, 2004). Pouze jeden druh *L. sativa* má hospodářský význam a pěstuje se jako listová zelenina – salát (Lebeda et al., 2007). Listy jsou jednoduché, členěné, celistvé a na okrajích ostnité. Bazální listy jsou uspořádané v růžici (Grulich, 2004). Lodyhy jsou 25 – 250 cm vysoké, lysé nebo ostnité, chlupaté nebo štětinaté. Horské druhy mohou být plazivé i liánovité. Úbory jsou bez plev s plochým lůžkem, drobné a početné květy se skládají ve vrcholičnatá, hroznovitá, latovitá nebo klasovitá květenství. Květy jsou jazykovité (v počtu 4 – 25 někdy až 50) s ligulou ve žlutém, modrém nebo fialovém provedení, vzácně i v bílém. Plodem je světle zelená, hnědá nebo černá nažka s větvenitým a silně zploštělým tvarem. Charakteristickým znakem nažky je přítomnost, nebo nepřítomnost zobánku, který může být buď delší, nebo kratší než tělo nažky. U většiny druhů se na okraji nažky vyskytují úzká křídla a na povrchu nažky se nacházejí žebra. Chmýr je bílý, nebo nažloutlý a skládá se z jedné řady buněk (výjimečně i z více řad). Paprsky chmýru jsou přibližně stejně dlouhé, jednoduché a opadavé (Doležalová et al., 2002; Ferráková, 1977; Grulich, 2004).

2.1.1 Geografické rozšíření rodu

Rod zahrnuje celkem 17 evropských, 43 afrických, 51 asijských, 12 amerických druhů a 3 australské druhy (Lebeda et al., 2014). Jednotliví zástupci rodu jsou z ekologického hlediska velmi variabilní a osídlují různé typy biotopů. Většina druhů je xerofilních, což znamená, že byliny jsou přizpůsobeny k růstu v suchých oblastech

s teplým klimatem (Lebeda et al., 2001). Druhy se převážně vyskytují v mírném a teplém pásu severní polokoule: Evropa, Asie, Afrika, Indonésie, jihovýchodní Čína, Severní a Střední Amerika (Feráková, 1977; Lebeda & Astley, 1999; Grulich 2004).

Rod *Lactuca* je velmi variabilní. Běžné evropské druhy jako např.: *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa* jsou synantropní (ruderní) a preferují narušená stanoviště. Vyskytují se hojně kolem příkopů, cest a dálnic (Lebeda et al., 2004). Jiné druhy jako např. *L. gracea* Boiss., *L. perennis* L., *L. viminea* (L.) J.Presl & C.Presl a *L. tenerrima* Pourr. patří mezi kalcifilní druhy, rostoucí v dolomitových a vápencových oblastech nebo také hojně na vápencových skalách (Feráková 1977; Lebeda et al., 2009a). Druhy jako *L. aurea* (Sch.Bip. ex Vis. & Pančić) Stebbins, *L. biennis* (Moench) Fernald., *L. quercina* L. a částečně také *L. sibirica* (L.) Benth. ex. Maxim., jsou součástí lesních porostů (Feráková, 1977) a *L. tatarica* C.A.Mey. a *L. acanthifolia* (Willd.) Boiss., rostou jako plevel na pobřežních útesech (Doležalová et al., 2002). *Lactuca tatarica* roste v chladných oblastech společně se stepní vegetací, převážně na slaných loukách nebo písčitéch substrátech. Původní lokalita druhu *L. acanthifolia* jsou útesy na pobřeží. (Feráková, 1977). V Asii se vyskytují druhy např. *L. altaica*, *L. aculeata*, *L. azerbaijanica*, *L. georgica*, *L. scarioloides*, a z Jižní Afriky pochází *L. dregeana*. Některé taxony (např.: *L. serriola*, *L. saligna*) byly zavlečeny do Austrálie, kde postupně naturalizovaly (Burbinge & Gray, 1970).

Taxony jako např. *L. viminea* subsp. *alpestris* (Gand.) Ferakova, *L. tatarica*, *L. altaica*, *L. tenerrima* a *L. quercina* subsp. *wilhelmsiana* (DC.) Ferakova, byly zaznamenány ve výškách do 2500 m n. m. Nicméně, optimální nadmořská výška pro většinu evropských druhů je v rozmezí 200 – 600 m n. m. (Feráková, 1977; Lebeda, 2001). Komplexní údaje o geografickém rozšíření a ekologii afrických, asijských a amerických druhů rodu *Lactuca* však chybí (Lebeda et al., 2004).

2.1.2 Taxonomie rodu

Rod *Lactuca* patří k jedné z největších rostlinných čeledí Asteraceae. V rámci této čeledě se řadí do podčeledi Cichorioideae, kmene Cichorieae (Lactuceae), podkmen *Lactucinae*, skupiny *Cichorium* podskupiny *Crepis* (Doležalová et al., 2002). Podle současné literatury rod zahrnuje 98 planě rostoucích druhů (17 evropských, 51 asijských 3 australských, 43 afrických a 12 severoamerických) (Lebeda et al., 2014).

Tuisi (1968) rozdělil skupinu *Lactuca* s. l. do šesti sekcí: *Scariola* F.W. Schmidt, *Mulgedium* Cass., *Cicerbita* Wallr., *Cephalorrhynchus* Boiss., *Steptorhamphus* Bunge a *Lactuca* L. Stebbins (1937) definoval v rámci rodu *Lactuca* pět samostatných podrodů *Cicerbita* Wallr., *Mulgedium* Cass., *Mycelis* Cass., *Lactucopsis* Schultz-Bip. ex Vis. et Panč. a *Phaenixopus* Cass. Feráková (1977) přeskládala z předchozích dvou klasifikací rod *Lactuca* do čtyř sekcí: *Mulgedium* (Cass.) C.B. Clarke, *Phaenixopus* (Cass.) Benth, *Lactuca* a *Lactucopsis* (Schultz-Bip. ex Vis. et Panč.) Rouy. Lebeda et al. (1998) rozšířili rod o africkou a severoamerickou skupinu a také o asijské sekce: *Micranthae*, *Sororiae* a *Tuberosae*.

V taxonomii rodu je nejčastěji aplikováno široké pojetí rodu, ve kterém jsou druhy uspořádány celkem do sedmi sekcí (*Mulgedium*, *Lactucopsis*, *Phaenixopus*, *Tuberosae*, *Micranthae*, *Sororiae* a *Lactuca*) a dvou geografických skupin (severoamerická a africká skupina) (Lebeda et al., 2007). V sekci *Lactuca* se druhy rozlišují na základě počtu chromozomů na dvě podsekce *Lactuca* a *Cyanicae*. Podsekce *Lactuca* zahrnuje druhy, jako jsou např.: *L. altaica*, *L. aculeata*, *L. livida* Boiss. & Reut., *L. dregeana*, *L. sativa*, *L. saligna*, *L. serriola* a *L. virosa*, *L. azerbaijanica*, *L. scarioloides*. Do podsekce *Cyanicae* jsou řazeny druhy *L. tenerrima*, *L. perennis* a *L. intricata* Boiss. Zmíněné druhy jsou jednoleté nebo dvouleté byliny a mají charakteristický úbor složený z 10 – 30 žlutých květů. V sekci *Phaenixopus* jsou zařazené druhy především z oblasti Středomoří (Řecko, Kréta, Sardinie a Pyrenejský poloostrov). Sekce zahrnuje *L. acanthifolia*, asijské druhy *L. orientalis* Boiss. a endemické druhy *L. longidentata* Moris ex DC. a *L. viminea*. Zmíněné druhy jsou dvouleté až vytrvalé, úbor složený z 5 – 6 květů a lodyhy mají hustě rozvětvené. Sekce *Mulgedium* zahrnuje vytrvalé druhy *L. tatarica*, *L. sibirica*, *L. taraxacifolia* (Willd.) Hornem., které se vyskytují v severních oblastech Asie a Evropy. Květy jsou modré a málokdy bílé. Do sekce *Lactucopsis* patří dvouleté druhy (např. *L. quercina*) a vytrvalá *L. aurea*, které rostou v zalesněných oblastech Asie a Evropy a endemický druh *L. watsoniana* Trel., který pochází z Azorských ostrovů. Květenství je složeno z 6 – 15 žlutých nebo bílých květů, nažky jsou podlouhlé až eliptické. Asijské druhy se řadí především do sekcí *Tuberosae*, *Micranthae* a *Sororiae* (Lebeda 1998), ale v Asii se také nachází druhy řadící se do sekce *Lactuca*. Sekce *Tuberosae* zahrnuje druhy většinou se žlutými nebo modrými květy jako jsou *L. indica*, *L. raddeana*, *L. triangulata* Maxim., *L. formosana* Maxim., *L. lessertiana* (Wall. ex DC.) Wall. ex C.B. Clarke a *L. graciliflora* DC. Do sekce *Micranthae* se řadí

druhy s fialovými nebo purpurovými květy jako *L. auriculata* DC., *L. dissecta* D. Don, *L. glauciifolia* Boiss, *L. rosularis* Boiss. a *L. undulata* Ledeb. Sekce *Sororiae* zahrnuje pouze jeden druh s fialovými květy *L. sororia*. Africká skupina zahrnuje druhy *L. capensis* Thunb., *L. dregeana*, *L. glandulifera* Hook.f., *L. homblei* De Wild., *L. imbricata* Hiern, *L. praecox* R.E.F., *L. schweinfurthii* Oliver et Hiem a *L. tysonii* (Phillips) C. Jeffrey. Severoamerická skupina zahrnuje druhy *L. biennis*, *L. canadensis* L., *L. floridana* (L.) Gaertn., *L. graminifolia* Michx., *L. hirsuta* Muhl. ex. Nutt., *L. ludoviciana* (Nutt.) Riddell a *L. terrae-novae* Fernald (Lebeda et al., 2007).

Klasifikace rodu není úplná, protože je třeba získat více informací o morfologii, biologii, anatomii a molekulární struktuře jednotlivých druhů (Doležalová et al., 2002). Pravděpodobně v budoucnu může dojít ke změnám zařazení druhů na základě molekulárních studií, jejichž cílem je podrobnější odhalení fylogenetických vztahů *Lactuca* spp. (Doležalová et al., 2002; Lebeda et al., 2014).

2.2 Molekulární metody používány ve studii fylogeneze rodu *Lactuca*

Molekulární markery se používají ke studiu genetické variability od 60. let 20. století. Během posledních deseti let došlo k rapidnímu vývoji nových molekulárních markerů (Bretting & Widrlechner, 1993), které se hojně začaly používat ke zkoumání fylogeneze, genetické variability a v šlechtění. Začaly se více používat přístupy založené na genotypu než na fenotypu. Jejich rozvoj ovlivnil úspěšnost a rychlost šlechtění a získávání nových odrůd u pěstovaných rostlin (Simko, 2008).

První biochemické markery, které se začaly využívat při studiu genetické variability rodu *Lactuca*, byly – **izoenzymy** (polymorfní molekulární formy enzymů) (Bretting & Widrlechner, 1993). Izoenzymy byly definovány jako strukturně odlišné formy enzymu s kvalitativně stejnou katalytickou funkcí. Pochází z aminokyselinových změn, které způsobují změny v prostorové struktuře molekuly enzymu (Hadačová & Ondřej, 1972; Vallejos, 1983; Soltis & Soltis, 1989). Jedná se o kodominantní markery, jejichž pomocí lze odlišit na daném lokusu jedince s heterozygotní konstitucí alel od homozygotů. Izoenzymová analýza se používala k charakteristice genových sbírek rodu *Lactuca* (Lebeda & Pink, 1998). Dále se metoda používala k identifikaci mezidruhových hybridů, k určování polyploidie a příbuznosti mezi volně rostoucími kulturními druhy rodu *Lactuca* (Dziechciarková et al., 2004; Lebeda et al., 2009b; Lebeda et al., 2012). Polymorfismus, hodnocen pomocí izoenzymů, blízkce příbuzných druhů byl relativně nízký, a omezoval řešení otázek mezidruhových vztahů (Kesseli et al., 1991). Z tohoto důvodu se objevuje tendence hledat nové citlivější metody, které by eliminovaly nevýhody izoenzymových technik. Izoenzymová analýza proto byla postupně nahrazena variabilnějšími typy markerů (Řepková & Relichová, 2001), které jsou dále v textu ve stručnosti popsány.

RFLP, neboli polymorfismus délky restričních fragmentů je metoda založená na štěpení DNA specifickou restriční endonukleázou. Různé velikosti neboli délky restričních fragmentů získané po rozštěpení endonukleázou slouží k rozlišení rostlinných druhů, genotypů a v některých případech i jedinců (Karp et al., 1998). RFLP metoda byla použita i při studiu rodu *Lactuca* v pracích Landry et al. (1987), Kesseli et al. (1991, 1994) a Vermeulen et al. (1994).

Kesseli et al. (1991) použili analýzu pro stanovení původu pěstovaného salátu (*L. sativa*). Z dat získaných pomocí techniky RFLP vyplynulo, že *L. sativa* je úzce příbuzná s druhem *L. serriola*, ale nikoliv s žádným jiným druhem zahrnutým do této studie (*L. saligna*, *L. virosa*, *L. perennis* a *L. indica*). Studie potvrdila značné genetické rozdíly mezi druhy. Výsledky studie naznačují polyfyletický původ pěstovaného salátu. Soubor RFLP markerů napomohl také k vytvoření podrobné genetické mapy hlávkového salátu (Landry et al., 1987). Omezení u této metody je to, že je technicky a finančně náročná, a proto byly hledány další metody. To umožnil především objev polymerázové řetězové reakce (PCR) pro amplifikaci DNA, který vedl k vývoji řady nových technologií, které pomohly překonat metodu RFLP (Dziechciarková et al., 2004).

RAPD (náhodně amplifikované polymorfnní části DNA) je technika založená na polymerázové řetězové reakci (PCR). Danou metodu poprvé použili Williams et al., (1990). Metoda je založená na enzymatické amplifikaci náhodných segmentů DNA za pomoci různých primerů. Technika byla použita na studium hlávkového salátu pro vyhodnocení variability a pro stanovení rozdílů mezi liniemi různých salátových odrůd (Waycott & Fort, 1994). Dvě odrůdy *L. serriola* odolné proti plísním byly zmapovány pomocí RAPD a markerů kódujících SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Maisonneuve et al, 1994). Kesseli et al. (1994) porovnali genetický polymorfismus u dvou markerů RFLP a RAPD mezi dvěma kultivary salátu při konstrukci genetické mapy. RFLP a RAPD markery ukázaly podobné rozložení v celém genomu, obě metody identifikovaly podobné úrovně polymorfismu. Pomocí metody RAPD byla identifikace odrůd rychlejší. Metoda RAPD u rodu *Lactuca* byla použita také ve studiích Truco et al. (2007) a Yang (2007).

AFLP (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů) je metoda hodnotící variabilitu amplifikovaných restričních fragmentů. Ve všeobecnosti se AFLP markery používají v genetických studiích při hodnocení biologické rozmanitosti, analýze sbírek, genotypizaci jedinců a analýze genetických vzdáleností (Dziechciarková et al., 2004). AFLP technika byla použita pro stanovení fylogenetických vztahů mezi druhy rodu *Lactuca* v práci Hill et al. (1996). Hill et al. (1996) použili tuto metodu pro studium příbuzenských vztahů mezi salátem (*Lactuca sativa*) a pěti planými druhy *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. perennis* a *L. indica*. Ty samé genotypy byly analyzovány už

v dřívější studii, kde byly použity RFLP markery. Analýza shlukování ukázala, že všechny testované druhy (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. perennis* a *L. indica*) se zobrazily jako odlišné jednotky. Vzorky *L. serriola* tvořily sesterský klastř k větvi *L. sativa*. Tento výsledek poukázal na příbuznost mezi *L. serriola* a *L. sativa* (Lindqvist 1960; Kesseli et al., 1991). Metoda AFLP byla také použita k objasnění vztahů mezi druhy rodu *Lactuca* a druhy z příbuzných druhů (Koopman et al., 2001). Výsledky neprokázaly rozdíl mezi druhy *L. sativa*, *L. serriola*, *L. dregeana* a *L. altaica* a autoři předpokládali, že výše zmiňované druhy jsou konspecifické, tedy náležící ke stejnému druhu. Technika AFLP byla také použita k vytvoření AFLP mapy pěstovaného salátu (Jeuken et al., 2001). Lebeda et al. (2009) studovali pomocí metody AFLP vztahy mezi 50 populacemi *L. serriola*. Studované populace pocházely z různých geografických oblastí. Studie ukázala, že populace pocházející z různých ekologicko-geografických oblastí Evropy se výrazně lišily v genetickém polymorfismu a v morfologii. Některé evropské populace *L. serriola* (např. ze Skandinávie a Anglie) se zdají být izolované a homogenní, naopak populace vyskytující se ve Střední Evropě jsou geneticky značně polymorfni.

Ve srovnání s jinými metodami, např. RAPD, RFLP nebo mikrosatelity, je metoda AFLP schopna detekovat vyšší úroveň variability, je tedy považována za metodu vhodnou pro odlišení blízké příbuzných druhů nebo populačně genetické studie (Dziechciarková et al., 2004).

Jako **mikrosatelity** se označují krátké úseky DNA, které jsou složeny z jednoduchého opakujícího se sekvenčního motivu o délce 1-6 nukleotidových bazí (mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- nukleotidové repetice). Mikrosatelitové sekvence jsou vhodné pro rozlišení blízké příbuzných genotypů (Smith & Devey, 1994) a také jsou zvláště vhodné k identifikaci příbuzných odrůd (Vosman et al., 1992). Používá se při studiu vnitrodruhové variability, genetické struktury a toku genů. Výhodou této metody je kodominance, velké množství alel na lokus a vysoká reprodukovatelnost analýz. U rodu *Lactuca* bylo publikováno několik prací, které využívaly mikrosatelity (např.: van de Wiel et al., 1999; Alexander et al., 2009). Bohužel autoři těchto prací nezveřejnili sekvence použitých mikrosatelitních primerů. Díky projektu CGP (Compositae Genome Projekt) byla založena databáze EST (Expressed Sequence Tags = exprimované sekvenční značky), kde se publikovalo 200 000 EST sekvencí, které byly získané z druhů *L. perennis*, *L. sativa*, *L. serriola*, *L. virosa* a *L. saligna*. Informace uložené

v této databázi byly využity pro navržení několika sad mikrosatelitních markerů (tzv. EST-SSR markery), které jsou dostupné pro širší vědeckou veřejnost (Simko, 2009; Riar et al., 2011). Riar et al. (2011) studovali využití EST-SSR markerů u druhu *L. serriola* a *L. perennis* a *L. sativa*. Studie potvrdila vhodnost využití EST-SSR markerů pro studium genetické variability v rámci rodu *Lactuca*. Mikrosatelity jsou nejpoužívanější genetické markery, díky vysokému polymorfismu a jsou společně s AFLP vhodnou metodou pro studium genových zdrojů rodu *Lactuca* (Spooner et al., 2005). Např. Jemelková et al. (2015) provedli pomocí mikrosatelitů a AFLP první podrobný výzkum zaměřený na poznání genetické variability v populacích *L. aculeata* z široké geografické oblasti Blízkého východu (Turecko, Jordánsko a Izrael).

Mikrosatelity mají význam pro budoucí studie rodu *Lactuca*, pro rozlišování jednotlivých kultivarů a pro screening rozmanitosti genetických zdrojů (Dziechciarková et al., 2004). Mikrosatelity a AFLP byly použity a jsou používány k charakterizaci sbírek salátu v genových bankách např. CGN ve Wageningenu (Hintum van et al., 2003).

Sekvenování vybraných úseků DNA je metoda, při které se určí pořadí nukleotidů ve studovaném úseku DNA. Metoda poskytuje velké množství znaků ke zkoumání. Standardně jsou hodnoceny úseky o délce 700 – 900 párů bází (pb). Díky ukládání sekvenčních dat v genové bance (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) je možné zahrnout do analýz i vzorky z různých geografických oblastí, které nejsou lehce dostupné. Sekvenovat se mohou krátké úseky DNA tzv. Sangerovou metodou (Sanger et al., 1977) nebo celý genom. Sekvenování se používá zejména při studiu mezidruhově hybridizace, fylogenezi, vzniku a původu druhů (Weising et al., 2005).

Rod *Lactuca* byl zpracován v mnoha studiích, ale chybí podstatné informace o fylogenetickém uspořádání rodu, protože se studovaly jen omezené počty druhů z rodu (např. Koopman et al., 1998; Wang et al., 2013; Wei et al., 2017). Wang et al. (2013) publikovali fylogenetickou rekonstrukci subtribu *Lactucinae* pomocí molekulárních technik. Poskytli první komplexní fylogenezi této taxonomicky složité skupiny a použili ji společně s morfologickými údaji jako základ pro obecnou klasifikaci subtribu.

V rozsáhlé molekulární studii, která měla za cíl rekonstrukci evolučního vztahu mezi endemickými africkými druhy rodu *Lactuca*, byly použity chloroplastové markery *ndhF* a *trnL* – *trnF* a jaderný lokus ITS (Wei et al., 2017). Na základě výsledku z této

studie rod *Lactuca* obsahuje dvě základní skupiny: "*Pterocypsela*" a tzv. "crop skupinu" (neboli skupinu příbuzných taxonů kolem druhu *L. sativa*). Severoamerické a asijské druhy buď tvoří malé skupiny, nebo jsou shlukovány s druhy *Melanoseris*. Autoři poukazují, že rody *Melanoseris* a *Lactuca* jsou sice odlišné, ale blízce příbuzné. Nově identifikované endemické druhy z Afriky by mohly být považovány za nový rod, ačkoli k tomu je potřeba podrobnější analýza.

Pro pochopení fylogenetických vztahů jsou užitečné kompletní sekvence genomů získané pomocí celogenomového sekvenování. Metoda celogenomového sekvenování je finančně velmi nákladná a vědci se snaží o cílené obohacování přesně definovaných úseků genomické DNA (tzn. délka sekvenované oblasti genomu se omezí jen na studovanou oblast). Díky tomu dojde ke snížení nákladů na samotnou sekvenaci. U rodu *Lactuca* se tyto metody aplikují především u kulturního salátu. Kompletní genom chloroplastu *L. sativa* byl získán technikou Sangerova sekvenování (Timme et al., 2007). V loňském roce byly publikovány dvě zásadní práce popisující obecné charakteristiky genomu a evoluce *L. sativa* (Zhang et al., 2017; Reyes-Chin-Wo et al., 2017).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál (listy) pro tuhle práci byl poskytnut nizozemskou pěstitelskou firmou RIJK ZWAAN. Listy z dospělých jedinců byly sbírány v roce 2015 pracovníky katedry botaniky (prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.; doc. Ing. Eva Křístková, Ph.D.) v pěstitelských sklenicích firmy v Nizozemsku.

V této práci bylo použito celkem 41 druhů pocházejících z různých oblastí a celkově se pracovalo s 95 vzorky. Seznam použitých druhů, jejich geografických původ a počet analyzovaných jedinců z každého druhu je uveden v Tabulce 1 (další identifikační údaje jsou dostupný na požádání u doc. Ing. Evy Křístkové, Ph.D.).

Tabulka 1 Seznam použitých rostlin, jejich původ a počet jedinců z každého druhu.

Taxonomická skupina	Číslo vzorku	Druh	Původ
<i>Cephalorrhynchus</i>	Tax_191	<i>L. takhadzhinii</i>	Arménie
<i>Chondrilla</i>	Tax_152	<i>Chondrilla</i> sp.	Ázerbájdžán
<i>Ixeris</i>	Tax_151	<i>Ixeris sonchifolia</i>	původ neznámý
<i>Phoenixopus</i>	Tax_153	<i>L. acanthifolia</i>	Řecko
	Tax_197		Řecko
<i>Lactuca</i>	Tax_98	<i>L. aculeata</i>	Izrael
	Tax_100		Izrael
	Tax_103		původ neznámý
	Tax_125		Turecko
	Tax_166		Turecko
<i>Lactuca</i>	Tax_126	<i>L. altaica</i>	Turecko
	Tax_136		Kyrgyzstán
	Tax_137		Kyrgyzstán
	Tax_138		Kyrgyzstán
	Tax_145		Arménie
<i>Micranthae</i>	Tax_161	<i>L. auriculata</i>	Kyrgyzstán
North American Group	Tax_106	<i>L. biennis</i>	Kanada
	Tax_90	<i>L. canadensis</i>	Spojené státy americké
	Tax_107		Spojené státy americké
	Tax_108		Spojené státy americké
African group	Tax_74	<i>L. capensis</i>	Jihoafriická republika
	Tax_149		Tanzanie
<i>Lactuca</i>	Tax_01	<i>L. dregeana</i>	původ neznámý
	Tax_02		původ neznámý
	Tax_03		původ neznámý
North American Group	Tax_120	<i>L. floridana</i>	Spojené státy americké
<i>Lactuca</i>	Tax_109	<i>L. georgica</i>	Gruzie
	Tax_110		Gruzie
	Tax_119		Gruzie
	Tax_146		Gruzie

Taxonomická skupina	Číslo vzorku	Druh	Původ
<i>Tuberosae</i>	Tax_04	<i>L. indica</i>	původ neznámý
	Tax_05		Čína
	Tax_06		původ neznámý
	Tax_105		Jihoafrická republika
<i>Lactuca</i>	Tax_162	<i>L. livida</i>	Portugalsko
	Tax_164		Portugalsko
North American Group	Tax_78	<i>L. ludoviciana</i>	Spojené státy americké
	Tax_79		Spojené státy americké
	Tax_154	<i>L. palmensis</i>	neznámý původ
	Tax_195	<i>L. parishii</i>	Thajsko
<i>Cyanicae</i>	Tax_07	<i>L. perennis</i>	Švýcarsko
	Tax_160	<i>L. pseudorientalis</i>	Kyrgyzstán
<i>Lactucopsis</i>	Tax_193	<i>L. quercina</i>	Arménie
	Tax_194		Arménie
<i>Tuberosae</i>	Tax_192	<i>L. raddeana</i>	původ neznámý
<i>Lactuca</i>	Tax_77	<i>L. saligna</i>	Itálie
	Tax_94		Izrael
	Tax_99		Itálie
	Tax_104		Slovensko
<i>Lactuca</i>	Tax_124	<i>L. sativa</i>	neznámý původ
	Tax_127		Španělsko
	Tax_139		Gruzie
<i>Lactuca</i>	Tax_148	<i>L. scarioloides</i>	Turecko
<i>Lactuca</i>	Tax_13	<i>L. serriola</i>	Španělsko
	Tax_22		Izrael
	Tax_23		Izrael
	Tax_177		Jihoafrická republika
	Tax_180		Jihoafrická republika
	Tax_15		Spojené státy americké
	Tax_24		Spojené státy americké
	Tax_42		Španělsko
	Tax_52		Rakousko
	Tax_59		Francie
	Tax_68		Spojené státy americké
	Tax_81		Spojené státy americké
	Tax_95		Spojené státy americké
	Tax_09	<i>L. serriola?</i> (<i>Ixeridium dentatum</i>)	Japonsko
<i>Mulgedium</i>	Tax_10	<i>L. sibirica</i>	Rusko
<i>Sororiae</i>	Tax_190	<i>L. sororia</i>	Japonsko
<i>Mulgedium</i>	Tax_111	<i>L. taraxacifolia</i>	původ neznámý
	Tax_184		původ neznámý
<i>Mulgedium</i>	Tax_96	<i>L. tatarica</i>	Ruská federace
<i>Cyanicae</i>	Tax_92	<i>L. tenerrima</i>	Španělsko
	Tax_147		Kypr
	Tax_155	<i>L. tetrantha</i>	Kypr
	Tax_176		Kypr
<i>Tuberosae</i>	Tax_196	<i>L. triangulata</i>	Jižní Korea
	Tax_178	<i>L. triquetra</i>	Kypr
	Tax_179		Kypr
	Tax_183		Kypr
<i>Micranthae</i>	Tax_150	<i>L. undulata</i>	Jordánsko
<i>Phoenixopus</i>	Tax_18	<i>L. viminea</i>	Slovensko
	Tax_118		Francie
	Tax_140		Francie
	Tax_168		Francie
<i>Lactuca</i>	Tax_85	<i>L. virosa</i>	Spojené státy americké
	Tax_86		Spojené státy americké
	Tax_87		Spojené státy americké
	Tax_91		Spojené státy americké
	Tax_133		Francie
	Tax_11	<i>Lactuca sp.</i>	původ neznámý
	Tax_12		původ neznámý
<i>Mycelis</i>	Tax_135	<i>Mycelis muralis</i>	Turecko
	Tax_141		Slovensko
	Tax_167		Slovensko

3.2 Izolace DNA

Cílem izolace nukleových kyselin je extrakce čisté nerozštěpené DNA bez příměsi RNA, bílkovin nebo sekundárních metabolitů. U výše uvedeného rostlinného materiálu (Tab. 1) byla izolována celková genomická DNA (gDNA). Izolace byla provedena RNDr. Miloslavem Kitnerem, Ph.D. Všechny další laboratorní práce byly pak už provedeny autorkou této práce.

3.2.1 Měření koncentrace a stanovení míry integrity vyizolované DNA

Důležitým krokem po vyizolování gDNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace a zjištění její kvality. Koncentrace a čistota veškeré izolované gDNA byly kontrolovány spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Podle naměřených hodnot, které se pohybovaly od 29,5 do 2710,9 ng/μl, byly všechny vzorky naředěné na koncentraci 10 ng/μl. Takto naředěné vzorky se používaly pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Integrita vyizolované DNA byla odhadnuta pomocí agarozové elektroforézy.

3.3 Amplifikace vybraných oblastí cp a nrDNA pomocí PCR

Pro testování amplifikace byly vybrány následující chloroplastové úseky: ndhF (primery ndhF-forward, ndhF-reverse, ndhF 913-forward; z práce Karis et al. 2001), trnL – trnF (primery c a f; z práce Taberlet et al. 1991), dále jaderný úsek ITS (ITS1 – 5.8SrDNA – ITS2; primery ITS1 a ITS4 z práce White et al. 1990) a úsek TOPO6 (primery Top6_2F, Top6_3F, Top8_R; z práce Blattner 2016). Přehled amplifikovaných úseků a sekvence primerů jsou seřazeny v Tabulce 4. Složení reakční směsi PCR reakce je uvedeno v Tabulce 2. Jako negativní kontrola náhodné kontaminace byl v každé reakci použit vzorek, kde místo DNA byla přidána destilovaná voda.

Tabulka 2 Složení reakční směsi pro PCR reakce. V závorkách jsou uvedeny počáteční koncentrace jednotlivých reakčních komponentů.

Komponenty PCR reakce (koncentrace)	Objem pro 1 vzorek
deionizovaná voda dH₂O	16,8 µl
Reakční pufr (10X)	2,5 µl
Přímý primer (10µM)	0,5 µl
Zpětný primer (10µM)	0,5 µl
Taq DNA-polymeráza (5U/µl)	0,2 µl
gDNA (10ng/µl)	4 µl
Celkový objem	25 µl

Před samotnou přípravou PCR reakce se jednotlivé komponenty reakce nechaly rozmraznout, potom se promíchaly pomocí vortexu a stočily v centrifuze. Příprava PCR reakce se prováděla ve flowboxu, aby se zabránilo kontaminaci jednotlivých komponentů reakce a gDNA. Všechny reakční komponenty byly v průběhu přípravy PCR reakce udržovány na ledu. Nejprve se připravil PCR premix v jedné zkumavce ze všech komponentů kromě gDNA. Následně se premix rozpipetoval do nachystaných mikrozkušavek. Poslední byla přidána templátová DNA a směs byla promíchána na mikrocentrifuze. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru s nastaveným programem pro PCR reakci (Tab. 3).

Tabulka 3 Program pro PCR reakci pro testované lokusy

	trnL-trnF	ITS	TOPO6	ndhF
Počáteční denaturace	95°C 3 min	95°C 5 min	95°C 5 min	94°C 3 min
Denaturace	95°C 30 s	95°C 30 s	95°C 30s	94°C 30 s
Nasedání primerů (Annealing)	50°C 30 s	56°C 30 s	59°C 30s	50°C 45 s
Prodlužování primerů (Elongation)	72°C 30 s	72°C 30 s	72°C 30s	72°C 1 min
Finální prodloužení (Final elongation)	72°C 15 min	72°C 10 min	72°C 10min	72°C 20 min
Konec reakce	10°C ∞	10°C ∞	10° C ∞	10°C ∞

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu (1,5g agarózy na 100ml 0,5X TBE pufru). Pro zviditelnění PCR vzorků bylo do roztoku přidáno 3 μ l interkalačního barviva GelRed (Biotum, USA). Připravený roztok byl nalit do vaničky s hřebínky. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty a vana byla přenesena do elektroforetické vany. Do jednotlivých jamek byly pipetovány PCR vzorky v množství 3 μ l smíchané s 1 μ l zelené barvy 5X Green Go Taq Buffer (Promega, USA). Separace vzorků byla prováděna po dobu 30 minut při napětí 80 V. Vizualizace a vyhodnocení úspěšnosti PCR reakce bylo provedeno v UV transiluminátoru Fire-Reader V4 (UVITEC, UK).

3.4 Pročištění vzorků před sekvenací

Před zasláním vzorků na sekvenaci bylo nutno vzorky pročistit a zbavit je zbytků nespoteřovaných primerů a nukleotidů. Pročištění se provádělo pomocí roztoku 20% PEG (+2,5 NaCl) následovně. Všechny vzorky byly nejprve promíchány na vortexu. Poté bylo každému vzorku napipetováno 22 μ l 20% PEG (+2,5 NaCl) a celý objem byl promíchán pomocí osmi kanálové pipety. Takto připravené vzorky se nechaly hodinu odstát. Po hodině se vzorky centrifugovaly, při 3700 otáčkách, po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován, díky čemuž zůstal na dně mikrokumavky vysrážený PCR produkt. K vysráženému produktu se přidalo 50 μ l 70% etanolu na pročištění a vzorky se znovu centrifugovaly při 3700 otáčkách, po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován a vzniklý sediment se usušil ve vakuové sušičce při teplotě 42°C po dobu 30 minut. Vysušené PCR produkty se nakonec rozpustily v 15 μ l deionizované vody a byly umístěné do lednice. Sekvence vzorků byla prováděna komerčně firmou Macrogen (Amsterdam, Nizozemí). Před samotnou sekvencí byly vzorky připraveny následovně: pět mikrolitrů z každého vzorku bylo napipetováno do 96 jamkové PCR destičky, ve které byly smíchané s pěti mikrolitry sekvenačního primeru (Tab. 4). Tímto způsobem připravené vzorky byly odeslány k sekvenování.

Tabulka 4 Testované DNA markery. Tabulka zahrnuje název markeru, označení primeru, sekvenci primeru a jejich použití.

marker	označení primerů	sekvence	použití
ITS	ITS 1-forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	PCR, sekvenace
	ITS 4-reverse	TCCTCCGCTTAATTGATATGC	PCR, sekvenace
trnL-trnF	c-forward	CGAAATCGGTAGACGCTACG	PCR, sekvenace
	f-reverse	ATTTGAACCTGGTGACACGAG	PCR
ndhF	ndhF-forward	AGGTAAGATCCGGTGAATCGGAAAC	PCR, sekvenace
	ndhF-reverse	ACCAAGTTCAATGTTAGCGAGATTAGTC	PCR, sekvenace
	ndhF 913-forward	GGAGCTACTTTAGCTCTTG	sekvenace
TOPO6	Top6_2F-forward	CGGAGAACAAGAAYATYGCKGG	PCR
	Top6_3F-forward	GYTWTGTTGARAATGKNCTTGATTC	PCR
	Top8_R-reverse	TCAATAGGSAGTCCSGTRCTCA	PCR

3.5 Zpracování sekvencí a fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly zpracovány a upraveny (ořezáním nečitelných částí) v programu BioEdit (Hall, 1997) a následně uloženy ve formátu FASTA. Upravené sekvence byly následně analyzovány pomocí programu MEGA6 (Tamura et al., 2013). Nejprve bylo provedeno seřazení sekvencí (alignment), tím došlo k vzájemnému seřazení homologních úseků pod sebe. V alignmentech byly zjištěny počty variabilních pozic, parsimonicky informativních pozic, jedinečných (singleton) a konzervativních pozic. Pro zjištění haplotypové/ribotypové diverzity (tedy počtu různých haplotypů/ribotypů) byl použit modul "DNA to haplotype collapser and converter" webového nástroje FaBox (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>) u všech hodnocených lokusů.

Neredukovaný alignment (alignment obsahující sekvence všech vzorků) byl použit k fylogenetickým analýzám provedeným v programu MEGA6. Taxony *Mycelis muralis* (L.) Dumat, *Chondrilla* sp. a *Ixeris sonchifolia* Willd. byly použité jako outgroup na zakořenění fylogenetického stromu. Fylogenetické analýzy byly provedeny v následujících variantách: a) pro lokusy trnL – trnF a ndhF samostatně, b) pro spojené lokusy trnL – trnF+ndhF, c) a pro lokus ITS. Pro analýzy byly použity dva přístupy: metoda maximální úspornosti (Maximum parsimony = MP) a metoda maximální věrohodnosti (Maximum likelihood = ML). Fylogenetické analýzy byly prováděny ve dvou setech, kdy set A obsahoval jenom vzorky z diplomové práce (Tab. 1) a set B obsahoval kromě vzorků setu A navíc i vzorky získané z databáze GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Z databáze GenBank byly staženy všechny

vzorky, které se v databázi nacházely, ze subtribu *Lactucinae* pro lokusy trnL-trnF a ITS (Tab. 10). U setu B byla provedena jen metoda maximální věrohodnosti.

U obou metod se ověřovala statistická podpora stromů pomocí bootstrapové analýzy (1000 replikací). Při rekonstrukci fylogenetického stromu byl vliv mezer (gapů) na analýzu posouzen tak, že mezery byly nejprve z analýzy úplně vyloučeny, poté částečně vyloučeny a nakonec byla pro rekonstrukci stromu použita všechna místa výsledného alignmentu (tj. metody implementované v programu MEGA6). Získané fylogenetické stromy byly poté navzájem porovnány a byl zhodnocen vliv mezer na rekonstrukci fylogeneze. Při MP analýze bylo ponecháno deset stejně dlouhých (parsimonických) stromů, ze kterých byl vytvořen výsledný konsenzuální strom. U metody maximální věrohodnosti se nejprve vybral vhodný substituční model evoluce DNA sekvencí pomocí modulu “Find best DNA model“ implementovaném v programu MEGA6, na základě zjištěné nejnižší hodnoty Bayesovského informačního kritéria (BIC) s přihlédnutím k Akaikeho informačnímu kritériu (AICc). Konkrétní modely, které se použily k vytvoření fylogenetických stromů metodou ML, jsou shrnuté v Tabulce 5.

Tabulka 5 Vybrané modely u metody maximální věrohodnosti, použité v setu A a v setu B u jednotlivých lokusů k rekonstrukci fylogeneze. T92 = Tamura 3-parametrový model (Tamura, 1992); GTR – General Time reversible model (Tavaré, 1986); n. a. = neanalyzované; přítomnost nevariantních míst (+ I) (Shoemaker a Fitch, 1989); gamma parametr (+ G) (Yang, 1994).

	SET A	SET B
trnL - trnF	T92+G	T92+G
ndhF	GTR+G	n. a.
ITS	GTR+G+I	GTR+G+I
spojené cpDNA	GTR+G	n. a.

4 VÝSLEDKY

Celkem bylo k analýzám v setu A použito 96 vzorků (41 druhů, Tab. 1). U většiny vzorků se mi podařilo získat PCR produkt při amplifikaci regionů *trnL* – *trnF*, *ndhF* a ITS. Chloroplastový lokus *trnL* – *trnF* se nepodařilo amplifikovat u dvou vzorků, lokus *ndhF* se nepodařilo amplifikovat u čtyř vzorků a jaderný úsek ITS se nepodařilo amplifikovat jen u jednoho vzorku. Testovaný lokus TOPO6 se nepodařilo amplifikovat ani u jednoho vzorku.

Různé přístupy k hodnocení mezer (gapů) neměly vliv na výslednou topologii stromů. U lokusu *trnL* – *trnF* bylo rozlišeno 30 haplotypů (Tab. 7), u lokusu *ndhF* 39 haplotypů (Tab. 8) a u lokusu ITS celkem 52 ribotypů (Tab. 9). Celková variabilita zkoumaných druhů v použitých lokusech vyjádřená počty variabilních, parsimonicky informativních, konzervativních a jedinečných (singleton) pozic byla spíše nižší (Tab. 6).

Tabulka 6 Charakteristika parsimonických analýz a použitých alignmentů

lokus		délka finálního alignmentu (bp)	počet parsimonicky informativních pozic	počet variabilních pozic	počet "singleton" pozic	počet konzervativních pozic
trnL-trnF	setA	861	67	108	41	743
ndhF	setA	2188	120	211	90	1968
spojený úsek trnL-trnF + ndhF	setA	3049	177	315	137	2678
ITS	setA	664	267	310	43	345

Ze získaných sekvencí jednotlivých lokusů (*trnL* – *trnF*, ITS a *ndhF*) byly zhotoveny fylogenetické stromy, u kterých byla porovnána jejich topologie, shlukování hodnocených taxonů, umístění jednotlivých taxonů na stromech a zobrazení fylogenetických vztahů. Získaná data byla dostatečně robustní napříč hodnocenými lokusy a poskytovala téměř stejný výsledek, přičemž topologie stromů byla velice podobná, a to jak u metody maximální úspornosti (MP), tak u metody maximální věrohodnosti (ML). Z důvodu minimálních rozdílů mezi zhotovenými MP a ML stromy v následujícím textu budou podrobněji rozebrány jenom výsledky shlukování taxonů pomocí metody maximální věrohodnosti (ML). V případě rozdílů shlukování taxonů mezi použitými metodami (ML vs. MP), tedy topologie fylogenetických stromů, jsou výsledky MP analýzy porovnávány s výsledky metody ML.

U všech zkonstruovaných stromů se vyčlenily skupiny "*Lactuca sensu lato*", zahrnující skupinu "*Lactuca sensu stricto*" a "*Scariola*", "asijská skupina", "afro-americká skupina", skupina taxonů "*perenis/undulata*" a "*sororia/triangulata*", jako monofyletické skupiny s vnitřními vztahy částečně nerozřešenými. Ve všech fylogenetických analýzách se také společně shlukovaly druhy *L. quercina*, *L. parishii* Craib. a *L. tatarica*. Vnitřní vztahy mezi jednotlivými taxony v rámci větších skupin však zůstaly většinou nerozřešeny, což je možno připsat na vrub celkově spíše nižšímu počtu informativních míst v sekvenovaných lokusech (Tab. 6).

Pro vytvoření fylogenetického stromu z jaderného úseku ITS metodou maximální věrohodnosti byl vybrán model T92+G+I (Tab. 5, Obr. 1). Téměř ve všech vnitřních skupinách byla pozorována polytomie – tj. nerozřešené fylogenetické vztahy. Zvláště se vyčlenily taxony *L. takhtadzhianii* Sosn. a *L. taraxacifolia*. *Lactuca tatarica* a *L. quercina* tvořily samostatnou skupinu spolu s taxonem *L. parishii*. Z druhů použitých jako "outgroup" je *Mycelis muralis* nejvíce příbuzný rodu *Lactuca*, nacházel se na samostatné větvi v rámci velké polytomie. Bližší vztahy mezi skupinami a zbylými taxony se však pomocí ITS lokusu nepodařilo rozřešit. Ze získaného stromu je patrné samostatné postavení skupiny amerických a afrických taxonů (Obr. 1), zatímco u metody maximální úspornosti (MP) tyto taxony tvořily společný klastr se dvěma jasně oddělenými skupinami, africkou a americkou (Obr. 1). S touto "afro-americkou" skupinou se klastrovaly také taxony *perennis/undulata*, které jinak ve všech ostatních analýzách měly umístění mimo tuto skupinu.

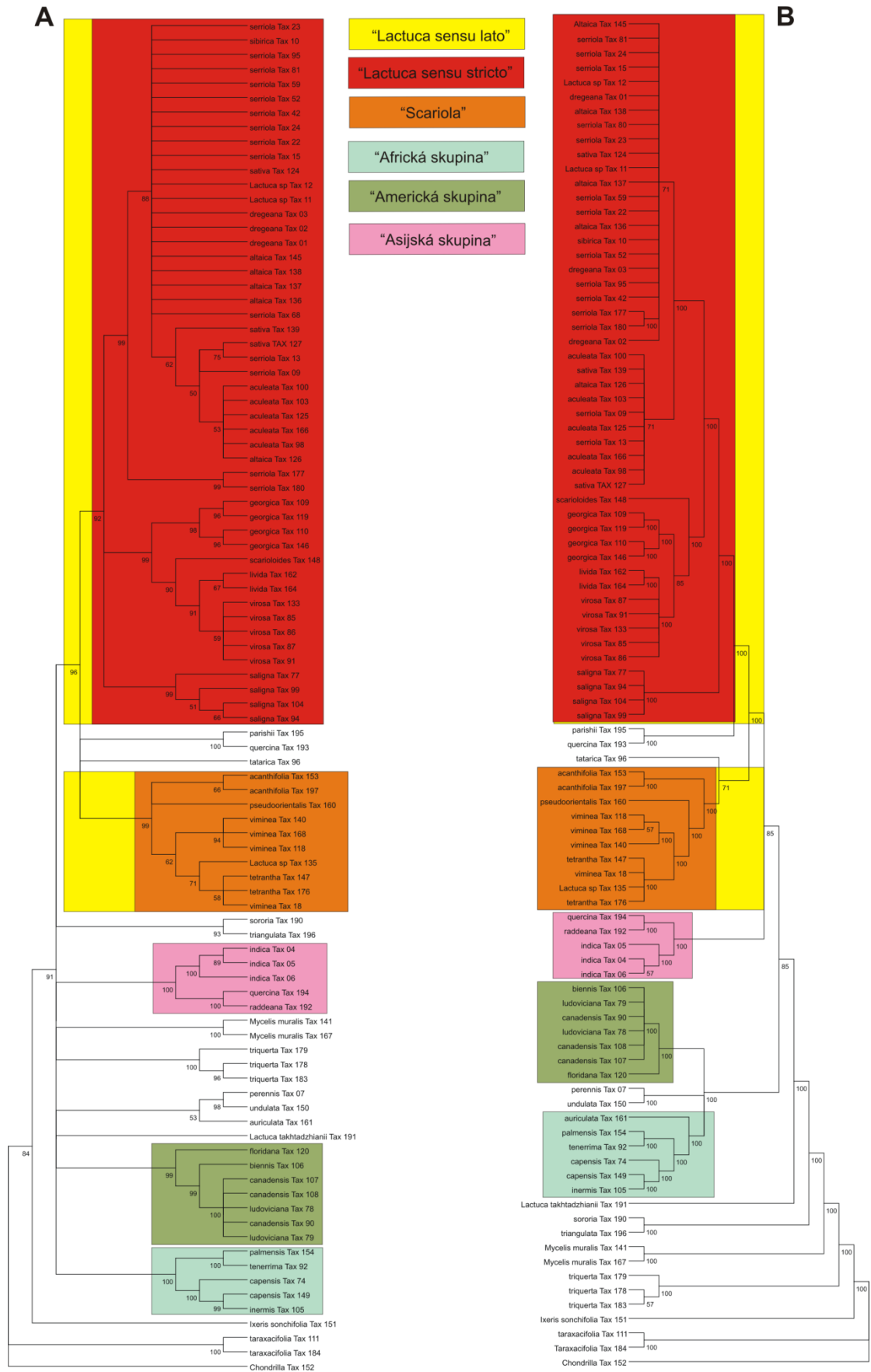
Pro vytvoření fylogenetického stromu z chloroplastového úseku *ndhF* metodou maximální věrohodnosti (ML) byl zvolen model GTR+G (Tab. 5, Obr. 2). Do analýzy byly přidány čtyři sekvence druhů z databáze GenBank (*L. sativa* kultivar *Salinas*, *L. sativa*, *L. ludoviciana* (Nutt.) Riddell, *Sonchus oleraceus*). *Sonchus oleraceus* vytvořil společný shluk s hodnocenými vzorky taxonu *L. taraxacifolia*. Samostatně se vyčlenily taxony *L. takhtadzhianii*, *L. triquerta* (Labill.) Boiss., přičemž *L. triquerta* se vyčlenila samostatně jako sesterská skupina vůči skupině *S. oleraceus/taraxacifolia*, taxonu *Mycelis muralis*, skupině *L. sorroria/triangulata* a zbylým hodnoceným taxonům (Obr. 2). Fylogenetický strom zhotoven metodou maximální úspornosti (MP) pro tento lokus byl shodný s výše popsaným ML stromem (Obr. 2).

Pro vytvoření fylogenetického stromu z chloroplastového úseku *trnL – trnF*, metodou maximální věrohodnosti (ML) byl vybrán model T92+G (Tab. 5, Obr. 3). Vnitřní vztahy ve velkých skupinách se nepodařilo rozřešit pomocí tohoto lokusu

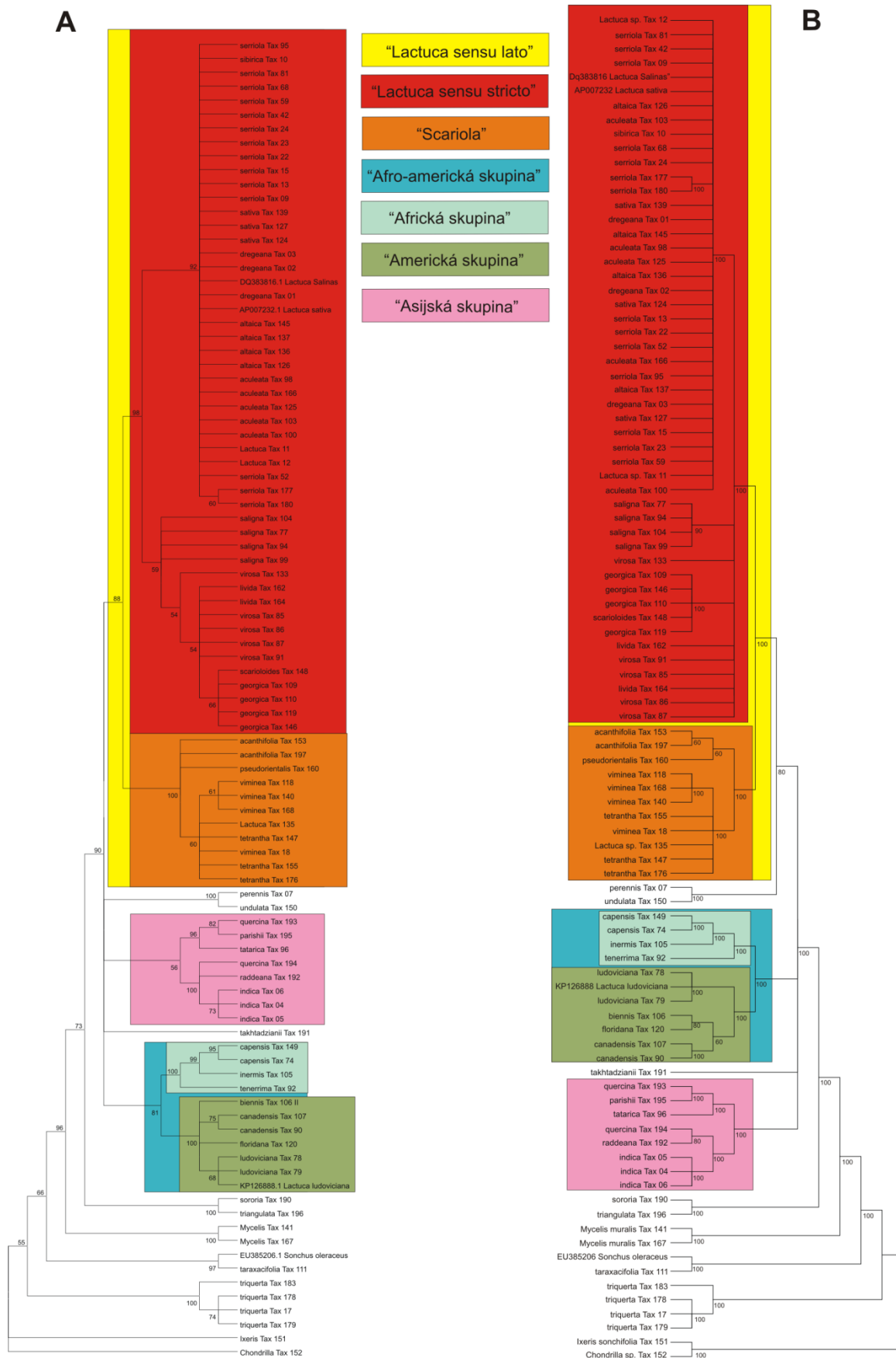
a je patrná velká polytomie (Obr. 3). Samostatně se vyčlenily taxony *L. taraxacifolia*, *Ixeris sonchifolia* a *L. triquerta*. U metody maximální úspornosti (MP) taxony *L. taraxacifolia*, *Ixeris sonchifolia* a *L. triquerta* tvořily jednu společnou skupinu (Obr. 3).

Pro vytvoření fylogenetického stromu ze spojených chloroplastových úseků trnL – trnF + ndhF metodou maximální věrohodnosti (ML) byl vybrán model GTR+G (Tab. 5, Obr. 4). Z výsledků je zřejmé, že americké a africké taxony vytvořily samostatný klastř se dvěma oddělenými skupinami. *Lactuca triquerta* se vyčlenila samostatně jako sesterská skupina k taxonům *L. taraxacifolia*, *Mycelis muralis* a ke skupině *L. sororia/triangulata* (Obr. 4). Asijská skupina se také vyčlenila samostatně. Velice podobný výsledek poskytla i metoda maximální úspornosti (Obr. 4).

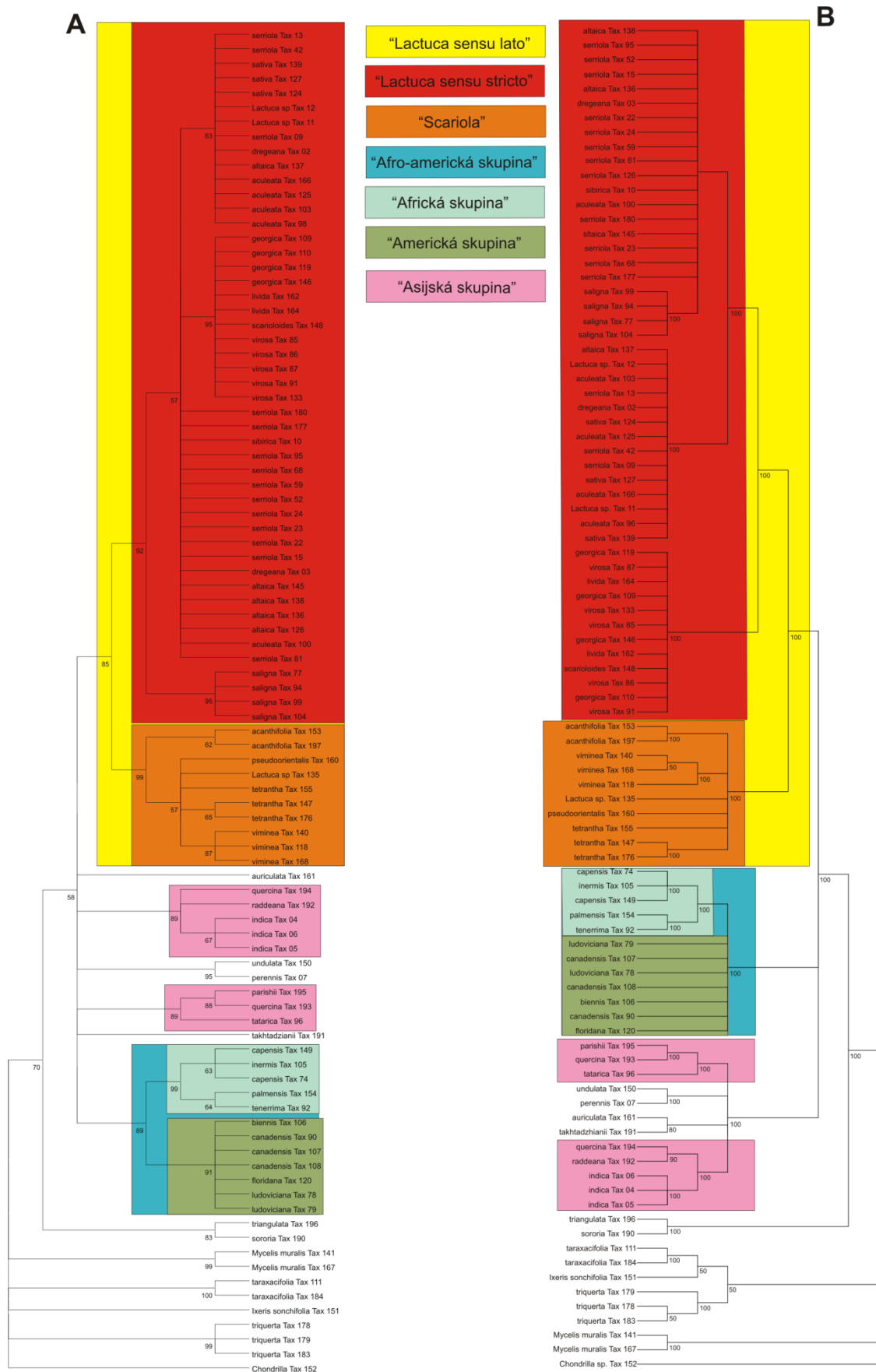
Jelikož v databázi GenBank se nacházely sekvence z subtribu *Lactucinae* jen pro dva (trnL – trnF a ITS) ze tří hodnocených úseků, fylogenetické analýzy na setu B byly provedeny jen pro tyto dva lokusy. Pro vytvoření fylogenetického stromu z chloroplastového úseku trnL – trnF byl vybrán model T92+G. Do analýzy byly přidány sekvence 118 druhů (Tab. 10, Obr. 5). Na stromě se vyčlenilo několik monofyletických skupin, přičemž hlavní skupiny pozorované v analýzách na setu A zůstaly zachovány: "*Lactuca sensu lato*" se dvěma jasně odlišnými skupinami: "*Lactuca sensu stricto*" a "*Scariola*", dále pak to byla skupina amerických taxonů společně se skupinou afrických taxonů, navíc se vyčlenily velké skupiny *Melanoseris/Chaetoseris* a *Paraprenanthes*. Podobně jako u setu A, tak u setu B, zůstaly vnitřní vztahy v těchto skupinách nerozřešeny a jsou zobrazeny jako rozsáhlá polytomie (Obr. 5). Pro vytvoření stromu z jaderného úseku ITS, byl vybrán model GTR+G+I (Tab. 10, Obr. 6) Na získaném fylogenetickém stromě se opětovně vyčlenily skupiny "*Lactuca sensu lato*" se dvěma jasně odlišenými skupinami: "*Lactuca sensu stricto*" a "*Scariola*", dále pak skupina asijských taxonů, kterým dominoval druh *L. indica*. Dále zůstala zachována skupina afrických taxonů, zatímco skupina amerických taxonů se rozpadla na vícero menších skupin, tvořených většinou jen jedním taxonem. Vzhledem k přítomnosti rozsáhlé polytomie není možné hodnotit fylogenetické vztahy mezi vytvořenými skupinami (Obr. 6).



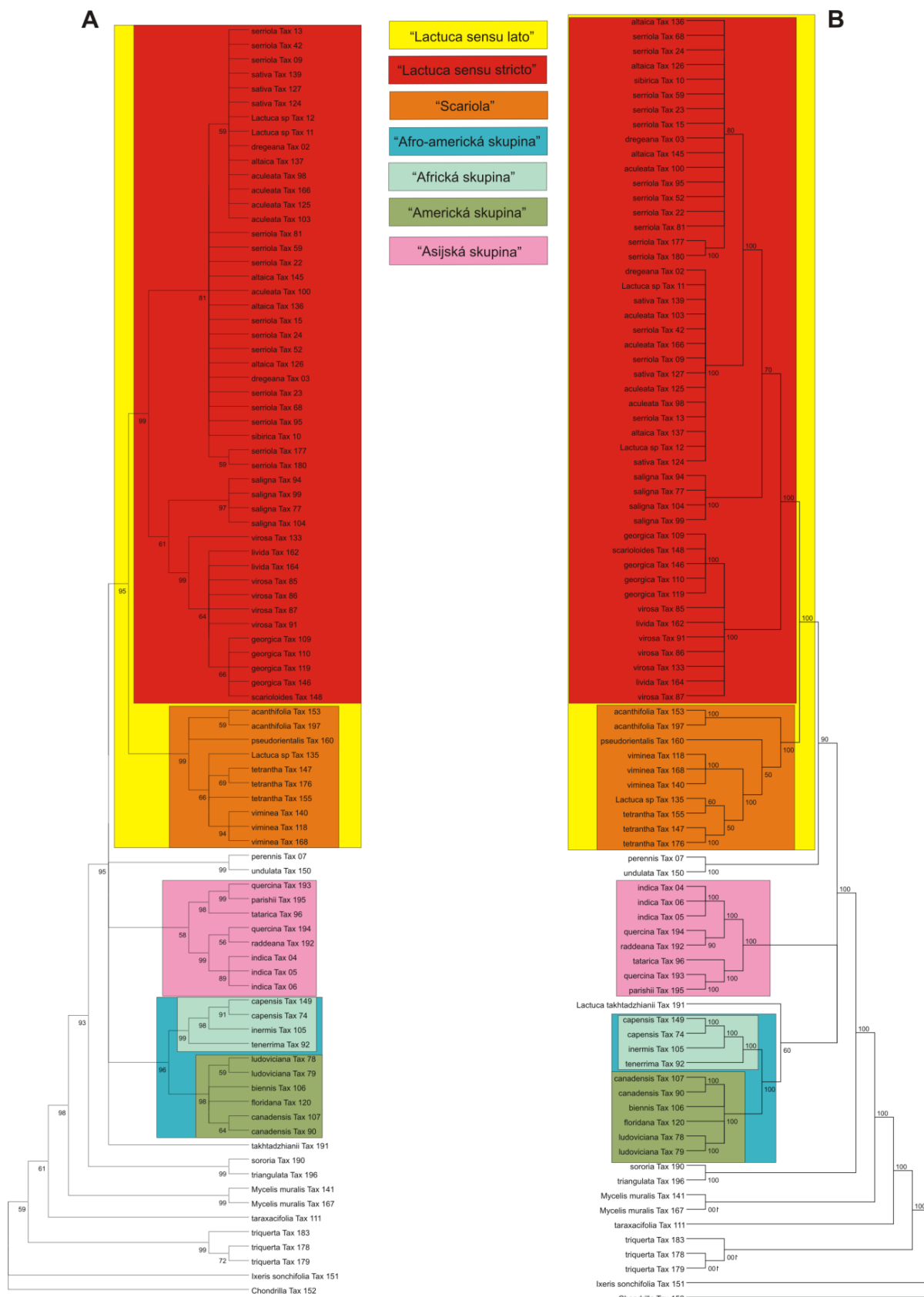
Obrázek 1 Fylogenetické stromy vytvořené z jaderného úseku ITS1-5.8SrDNA-ITS2. Stromy byly zakořeněny taxonem *Chondrilla* sp. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů vyšší než 50 %. Fylogenetický strom A byl vytvořen metodou maximální věrohodnosti a fylogenetický strom B byl vytvořen metodou maximální úspěšnosti.



Obrázek 2 Fylogenetické stromy vytvořené z chloroplastového úseku *ndhF*. Stromy byly zakořeněny taxonem *Chondrilla* sp. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů vyšší než 50 %. Fylogenetický strom A byl vytvořen metodou maximální věrohodnosti a fylogenetický strom B byl vytvořen metodou maximální úspěšnosti.



Obrázek 3 Fylogenetické stromy vytvořené z chloroplastového úseku *trnL* - *trnF*. Stromy byly zakořeněny taxonem *Chondrilla* sp. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů vyšší než 50 %. Fylogenetický strom A byl vytvořen metodou maximální věrohodnosti a fylogenetický strom B byl vytvořen metodou maximální úspěšnosti.



Obrázek 4 Fylogenetické stromy vytvořené z chloroplastových úseků *trnL* – *trnF* a *ndhF*. Stromy byly zakoreněné taxonem *Chondrilla* sp. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů vyšší než 50 %. Fylogenetický strom A byl vytvořen metodou maximální věrohodnosti a fylogenetický strom B byl vytvořen metodou maximální úspornosti.

5 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo pomocí metod molekulární biologie a fylogenetické analýzy zhodnotit vhodnost (informační hodnotu) vybraných jaderných a chloroplastových molekulárních markerů k rekonstrukci mezidruhových vztahů na rozšířeném datasetu rodu *Lactuca*, který obsahuje zástupce téměř všech hlavních skupin rozlišovaných v rodě. Použité lokusy byly vybrány tak, aby bylo možné zahrnout do fylogenetických analýz i taxony, které byly součástí dvou důležitých prací Wang et al. (2013) a Wei et al. (2017). V průběhu práce se však ukázalo, že sekvence lokusů v taxonů studovaných v práci Wei et al. (2017) se nenacházejí v žádné z veřejně dostupných databází a tedy nebylo možné zahrnout tyto africké endemické lokiky k analýzám provedeným v této práci.

První komplexní fylogenetická rekonstrukce subtribu *Lactucinae* byla provedena pomocí jaderného lokusu ITS a chloroplastových lokusů psbA-trnH, rpl32 trnL, trnL – trnF, a trnQ (Wang et al., 2013). Fylogeneze odvozená na základě chloroplastových markerů se lišila od fylogeneze postavené na jaderném lokusu, což se ukázalo v nesrovnalostech topologie stromů. I když se podařilo pomocí použitých lokusů rozlišit hlavní evoluční linie, evoluční vztahy mezi identifikovanými skupinami zůstaly nerozřešeny. Jedním z možných důvodů je pravděpodobně skutečnost, že během evoluce subtribu *Lactucinae* docházelo k opakované hybridizaci a mnohé taxony získaly znaky (i genetické) od rodiče, od kterého se to nepředpokládalo. Dalším důvodem může být také nízká informační hodnota vybraných markerů anebo chybějící taxony v analýzách (Wang et al., 2013).

Wei et al. (2017) hodnotili pomocí chloroplastových markerů ndhF a trnL – trnF a jaderného lokusu ITS fylogenetické vztahy mezi endemickými africkými taxony řazenými do rodu *Lactuca*. Z výsledků je patrné, že rod *Lactuca* obsahuje skupiny "*Pterocypsela*" a tzv. "crop clade" skupinu, neboli skupinu příbuzných taxonů kolem druhu *L. sativa*. Autoři poukazují, že rody *Melanoseris* a *Lactuca* jsou sice odlišné, ale blízce příbuzné rody. Nově identifikované endemické druhy z Afriky by mohly být považovány za nový rod, ačkoli k tomu je potřeba podrobnější analýza (Wei et al., 2017).

Ze získaných sekvencí jednotlivých lokusů (trnL – trnF, ndhF a ITS), pro taxony studované v této diplomové práci, byly zhotoveny fylogenetické stromy. Získaná data byla dostatečně robustní k tomu, aby dokázala v rámci studovaných taxonů rozlišit

skupinu pracovně označenou jako "*Lactuca* sensu lato", která je tvořena dvěma vnitřními skupinami "*Lactuca* sensu stricto", kterou tvoří taxony *L. sativa*, *L. serriola*, *L. dregeana*, *L. aculeata*, *L. altaica*, *L. sibirica*, *L. georgica*, *L. scarioloides*, *L. saligna* a *L. virosa* patřící do sekce *Lactuca* subsect. *Lactuca*. Ve studii Wei et al. (2017) se tyto taxony také spolu shlukovaly v skupině označené jako "crop clade". Podle studie Lebeda et al. (2007) *L. sativa* a *L. serriola* tvoří primární genofond, *L. saligna* tvoří sekundární genofond a *L. virosa* tvoří terciální genofond pro *L. sativa*. To znamená, že tyto druhy představují bohaté genetické zdroje pro další šlechtění a vylepšování vlastností pěstování salátu (*L. sativa*), např. pro získání odrůd odolných proti plísním, jelikož u všech výše zmíněných taxonů byla zjištěna odolnost proti některým plísním (Wei et al., 2017).

U fylogenetického stromu zkonstruovaném metodou ML z jaderného úseku ITS (Obr. 1) byla pozorována velká polytomie u vnitřních skupin. Taxony *L. sativa* a *L. serriola* se shlukovaly společně. Koopman et al. (1998) ve své studii fylogeneze postavené na jaderném úseku ITS také potvrdili blízkou příbuznost těchto dvou druhů. Druhou skupinou, v této práci nazývanou jako skupina "*Scariola*", tvořily druhy *L. viminea*, *L. tetrantha* B.L.Burtt & P.H.Davis, *L. acanthifolia*, *L. pseudorientalis*. Název "*Scariola*" byl zvolen podle toho, že všechny taxony, které se shlukovaly do této skupiny, byly (případně dle některých autorů stále jsou) řazeny do rodu *Scariola* F.W.Schmidt (Grulich, 2004). O taxonech, které tvořily skupinu "*Lactuca* sensu lato" lze jednoznačně říct, že jsou si ze všech hodnocených taxonů nejvíce příbuzné, mají společného předka, mají tedy monofyletický původ a měly by tvořit jádro rodu *Lactuca*.

Další skupinou, která byla pozorována ve většině analýz, byla skupina tzv. "afroamerických" taxonů. Ve všech analýzách setu A provedených z chloroplastových lokusů, tvořily tyto taxony společnou skupinu se dvěma jasně odlišenými skupinami, přičemž obě skupiny měly společného předka (Obr. 2 až 4). Avšak jaderný region ITS poukázal i na jinou možnou alternativu a tou je nezávislý původ těchto dvou skupin (Obr. 1). Ze získaných dat je však těžké hodnotit skutečné evoluční vztahy mezi těmito skupinami, jelikož v analýzách na rozšířeném setu B se jinak koherentní skupina amerických taxonů rozpadla na několik, jednoduchých větví s nerozřešenými vztahy k většině analyzovaných taxonů (Obr. 6). Každopádně, možnost společného předka, alespoň mezi některými z amerických a afrických zástupců rodu, je teoreticky

i prakticky možná (např. Obr. 5). Bylo by však potřeba analyzovat vícero druhů z těchto skupin.

Ve fylogenetických stromech taxony *L. sororia* a *L. triangulata* se shlucovaly vždy společně, i když paradoxně patří do jiných sekcí. *Lactuca sororia* je řazená do sekce *Sororiae*, zatímco *L. triangulata* je řazená do sekce *Tuberosae* (Lebeda et al., 2007). Zajímavý je fakt, že zatímco *L. triangulata* je akceptovaným jménem, *L. sororia* je podle databáze "The Plant List" (<http://www.theplantlist.org/>) jenom synonymum a platné jméno pro tenhle taxon je *Paraprenanthes sororia* (Miq.) C. Shih. Společné shlukování těchto dvou vzorků na všech zkonstruovaných stromech svědčí buď o blízké příbuznosti, nebo o záměně a chybném taxonomickém určení analyzovaných vzorků. Jelikož ke studovaným vzorkům nebyly zhotoveny herbářové doklady, správnost určení se bude muset provést opětovným výsevem. Jelikož taxony *L. sororia/triangulata* se na fylogenetických stromech zkonstruovaných ze setu B (Obr. 5 a Obr. 6) shlucovaly společně s jinými taxony označovanými jako *Paraprenanthes*, taxonomické postavení těchto druhů v rámci rodu *Lactuca* by mělo být přehodnoceno. Na stromě, zhotoveném z lokusu *trnL – trnF* na setu B, se *L. triangulata* shlučuje společně s několika vzorky taxonu *Paraprenanthes umbrosa* (Dunn) Sennikov., přičemž jejich sekvence byly shodné. To vede k domněnce, zda se nejedná spíše o taxon *L. umbrosa*, který je synonymem k pojmenování *P. umbrosa*.

V práci bylo použito několik vzorků od jihoafrického zástupce *L. dregeana*. Všechny zkoumané vzorky měly shodné haplotypy a ribotyp se vzorky taxonu *L. serriola* (Tab. 7 až 9). Je tedy pravděpodobné, že i v tomto případě došlo ke špatnému taxonomickému určení a vzorky ve skutečnosti nepředstavují taxon *L. dregeana* nýbrž *L. serriola*. Bohužel, kvůli neexistenci herbářových dokladů, nebylo možné danou nesrovnalost ověřit. Záměna je však velice pravděpodobná, jelikož oba taxony jsou si morfologicky velice podobné (Herwijnen & Manning, 2017). Další taxonomická nesrovnalost byla pozorována v případě dvou vzorků taxonu *L. quercina* (Tax_193 a Tax_194; Tab. 1), které se vždy shlucovaly odlišně (Obr. 1, 3, 4 a Tab. 7, 9). Při taxonomickém určení došlo s největší pravděpodobností k chybnému určení jednoho ze dvou vzorků (podle Obrázku 6 byl zřejmě špatně určen vzorek označený jako *quercina* Tax_194).

Problematické je rovněž hodnocení taxonu *L. taraxacifolia*, který se ve všech analýzách vyčlenil samostatně a tvořil sesterskou větev k ostatním hodnoceným taxonům (Obr. 1 až 4). Na ML stromě (Obr. 5) se tento taxon shlucoval společně

s jedním vzorkem *Lauaea sarmentosa*. Platný název pro tento taxon není *Lactuca taraxacifolia*, ale *Launaea taraxacifolia* (viz. databáze "The Plant List"; <http://www.theplantlist.org/>). U fylogenetického stromu, který byl vytvořen z úseku ndhF metodou ML a MP (Obr. 2), se taxon *Sonchus oleraceus* společně shlukoval s taxonem *L. taraxacifolia*. Wei et al. (2017) analyzovali také taxon *Sonchus oleraceus*, který se shlukoval s *Launaea sarmentosa*. Je tedy evidentní, že taxon označován jako *Lactuca taraxacifolia* potřebuje taxonomickou revizi. Téměř ve všech analýzách (Obr. 1 až 4) se samostatně vyčleňoval taxon *L. takhtadzhianii*, jehož synonyma jsou *Cephalorrhynchus takhtadzhianii* (Sosn.) Kirp. a *Zollikoferiastrum takhtadzhianii* (Sosn.) Kamelin. Na stromech zkonstruovaných ze setu B, se tento taxon shlukoval se zástupci rodu *Melanoseris* (Obr. 5) a zástupci rodu *Cephalorrhynchus* (Obr. 6). Z toho lze usoudit, že tento taxon zjevně nepatří do rodu *Lactuca* a jeho taxonomické postavení by mělo být také přehodnoceno.

Taxon *Mycelis muralis* je evidentně velice blízce příbuzný s rodem *Lactuca*, podle některých fylogenetických stromů (Obr. 1 až 4) dokonce více než taxony *L. triquerta* a nebo *L. taraxacifolia*. Avšak skutečné evoluční vztahy mezi tímto monotypickým rodem a rodem *Lactuca* se nepodařilo blíže rozřešit, protože ve všech analýzách setu B byl taxon umístěn do velké polytomie, tedy mezi taxony s nerozřešenými vztahy.

Všechny velké skupiny, pozorované na zkonstruovaných stromech, měly vysokou bootstrapovou podporu, což však nemusí nutně znamenat, že zobrazené fylogenetické vztahy jsou pravdivé. Genetická informace o příbuznosti mezi analyzovanými vzorky byla v použitých lokusech (trnL – trnF, ndhF a ITS) dostatečná k rozeznání hlavních skupin v rámci skupiny *Lactucae* (jako "*Lactuca* s. l.", "*Lactuca* s. str.", "*Scariola*", afro-americká a asijská skupina), přesto však nebyla dostatečná k rozlišení vnitřních vztahů uvnitř těchto velkých skupin. Ze zhotovených fylogenetických stromů nelze jednoznačně říct něco více o vztazích mezi skupinou asijských, afrických a amerických taxonů a také o jejich vztahu/příbuznosti ke skupině "*Lactuca* sensu lato". Přítomnost velké polytomie téměř u všech stromů naznačuje, že tyto lokusy nejsou zcela vhodné pro podrobnější rozřešení vztahů na tak nízké taxonomické úrovni (mezi druhy). Z práce je však evidentní, že chápání rodu *Lactuca* se liší mezi různými autory a taxonomické zpracování rodu si vyžaduje přehodnocení. V současném pojetí není rod monofyletický, nýbrž polyfyletický nebo parafyletický.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit použitelnost vybraných chloroplastových a jaderných lokusů ke zhodnocení fylogenetických vztahů na nízké taxonomické úrovni (mezi druhy) v rámci rodu *Lactuca*. Při testování úspěšnosti amplifikace byly nakonec vybrány úseky: jaderný úsek ITS a dva chloroplastové úseky trnL – trnF a ndhF.

U všech zkonstruovaných stromů se vyčlenily skupiny: "*Lactuca* sensu lato", "*Lactuca* sensu stricto", "*Scariola*", dále pak "asijská skupina", "afro-americká skupina", skupina taxonů *perenis/undulata* a *sororia/triangulata*, jako monofyletické skupiny, které měly vnitřní vztahy, jako i vztahy mezi jednotlivými skupinami, částečně nevyřešené. Závěrem lze říct, že použité lokusy jsou dostatečné k vyčlenění širších evolučních linií v rámci subtribu *Lactucinae*, avšak nejsou dostatečné na to, aby dokázaly rozřešit vnitřní vztahy mezi jednotlivými taxony v rámci rodu *Lactuca* a jiných blízce příbuzných rodů v rámci subtribu *Lactucinae*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alexander J. M., Poll M., Hansjorg D., Edwards P. J. (2009): Contrasting patterns of genetic variation and structure in plant invasions of mountain tains. *Diversity and Distributions* 15: 502-515.

Blattner F. R. (2016): TOPO6: a nuclear single-copy gene for plant phylogenetic inference. *Plant systematics and evolution*, 302(2): 239-244.

Bretting P. K., Widrlechner, M. P. (1993): Genetic markers and plant genetic resource management. P. 11- 86 in *Planr Breeding Reviews*, Volume 13, Edited by J Janick. John Wiley & Son Inc. Canada.

Burbinge N. T., Gray. M. 1970: Flora of the Australian capital territory. Australian National University Press, Canberra.

Doležalová I., Lebeda A., Křístková E. (2001): Prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) germplasm collecting and distribution study in Slovenia and Sweden. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 128: 41-44.

Doležalová I., Křístková E., Lebeda A., Vinter V. (2002): Description of morphological characters of wild *Lactuca* L. spp. genetic resources (English-Czech version). *HORT. SCI., Praha*, 29(2): 56-83.

Dziechciarková M., Lebeda A., Doležalová I., Astley D. (2004): Characterization of *Lactuca* spp. germplasm by protein and molecular markers-a review. *Plant Soil and Environment*, 50(2): 47-58.

Feráková V. (1977): The genus *Lactuca* L. in Europe. Komenský University Press, Bratislava (Czechoslovakia). 122 pp.

Grulich V. (2004): *Lactuca* L. – locika, pp. 487-497. In: Slavík B., Štěpánková J. (eds.) *Květena České republiky, díl 7*. Academia, Praha.

Hadačová V., Ondřej M. (1972): Isoenzymy. *Biol. Listy*, 37: 1-25.

Hall T. (1997): BioEdit version 7.1.9 (12/17/2012) Copyright (c) 1997-1999.

Harlan J. R., de Wet M. J., (1971): Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509-517.

- 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.
- Hintum Th. J. L. van, Lebeda A., Pink D. A., Schut J. W. (2003):** Eucarpia Leafy Vegetables 2003, Proceedings of the Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding. Noordwijkerhout, The Netherlands, 19-21 March 2003. Centre for Genetic Resources, The Netherlands (CGN), Wageningen, The Netherlands, 180 pp.
- Jemelková M., Kitner M., Křístková E., Beharav A., Lebeda A. (2015):** Biodiversity of *Lactuca aculeata* germplasm assessed by SSR and AFLP markers, and resistance variation to *Bremia lactucae*. *Biochem Syst Ecol* 61:344-356
- Jeuken M., Wijk R. van, Peleman J., Lindhout P. (2001):** An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* × *L. saligna* F2 populations. *Theor. Appl. Genet*, 103: 638-647.
- Karis P. O., Eldenäs P., Källersjö M. (2001):** New evidence for the systematic position of *Gundelia* L. with notes on delimitation of *Arctoteae* (Asteraceae). *Taxon*, 105-114.
- Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. (eds.) (1998):** Molecular tools for screening biodiversity. Chapman & Hall, London, UK
- Kesseli R., Ochoa O., Michelmore R. (1991):** Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome*, 34: 430-436.
- Kesseli R. V., Paran I., Michelmore R. W. (1994):** Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics*, 136: 1435-1446.
- Koopman W. J., Zevenbergen M. J., Ronald G., van den Berg R. G. (2001):** Species relationship in *Lactuca* S. L. (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *Am. J. Bot.*, 88: 1881-1887.
- Koopman W. J., Guetta E., van de Wiel C. C., Vosman B., van den Berg R. G. (1998):** Phylogenetic relationships among *Lactuca* (Asteraceae) species and related genera based on ITS-1 DNA sequences. *American Journal of Botany*, 85(11): 1517-1530.

- Landry B. S., Kesseli R. V., Farrara B., Michelmore R. W. (1987):** A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics*, 116: 331-337.
- Lebeda A., Pink D. A. C. (1998):** Histological aspects of the response of wild *Lactuca* spp. and *L. sativa* × *Lactuca* spp. hybrids to lettuce downy mildew (*Bremia Lactucae*). *Plant Pathol.* 47: 723-736.
- Lebeda A., Astley D., (1999):** World genetic resources of *Lactuca* spp., their taxonomy and biodiversity. In: *Eucarpia Leafy Vegetables '99, Proceedings of the Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding*, Lebeda, A., Křístková, E., Eds., Olomouc: Palacký University in Olomouc.
- Lebeda A., Doležalová I., Křístková E., Mieslerová B. (2001):** Biodiversity and ecogeography of wild *Lactuca* spp. in some European countries. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 153-164.
- Lebeda A., Doležalová I., Feráková V., Astley D. (2004):** Geographical distribution of wild *Lactuca species* (*Asteraceae, Lactuceae*). *The Botanical Review*, 70(3): 328-356.
- Lebeda A., Ryder E. J., Grübe R., Doležalová I., Křístková E. (2007):** Lettuce (*Asteraceae; Lactuca* spp). SINGH, R. J. (Ed.). *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Vol. 3, Vegetable Crops*, pp. 377-472. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Lebeda A., Doležalová I., Křístková E., Kitner M., Petrželová I., Mieslerová, B., Novotná A. (2009a):** Wild *Lactuca* germplasm for lettuce breeding: current status, gaps and challenges. *Euphytica*.
- Lebeda A., Kitner M., Dziechciarková M., Doležalová I., Křístková E., Lindhout P. (2009b):** An insight into the genetic polymorphism among European populations of *Lactuca serriola* assessed by AFLP. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 597-608.
- Lebeda A., Kitner M., Křístková E., Doležalová I., Beharav A. (2012):** Genetic polymorphism in *Lactuca aculeata* populations and occurrence of natural putative hybrids between *L. aculeata* and *L. serriola*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42: 113-123.

- Lebeda A., Mieslerová, B., Petrželová, I., Korbelová, P. (2013):** Host specificity and virulence variation in populations of lettuce powdery mildew pathogen (*Golovinomyces cichoracearum* s. str.) from prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Mycological Progress*, 12: 533-545.
- Lebeda A., Křístková E., Kitner M., Mieslerová B., Jemelková M., Pink D. A. (2014):** Wild *Lactuca species*, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. *European Journal of Plant Pathology*, 138(3): 597-640.
- Lindqvist K. (1960):** On the origin of cultivated lettuce. *Hereditas* 46: 319-350.
- Maisonneuve B., Bellec Y., Anderson P., Michelmore R.W. (1994):** Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 96-104.
- Reyes-Chin-Wo S., Wang Z., Yang X., Kozik A., Arikiti S., Song C., Xia L., Froenicke L., Lavelle D. O., Truco M. J., Xia R., Zhu S., Xu Ch., Xu H., Xu X., Cox K., Korf I., Meyers C. B., Michelmore W. R. (2017):** Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nature Communications*. 8: 14953.
- Riar D. S., Rustgi S., Burke I. C., Gill K. S., Yenish J. P. (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.
- Řepková J., Relichová E. (2001):** Molekulární markey, Brno. Atlantis, 64-69.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12): 5463-5467.
- Simko I. (2008):** Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity*, 100(2): 256-262.
- Smith D. N., Devey M. E. (1994):** Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome*, 37(6): 977-983.
- Soltis D. E., Soltis P. S. (1989):** Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.

- Spooner D. M., van Treuren R. R., de Vicente M. C. (2005):** Molecular markers for germplasm and genebank management. Technical Bulletin 10, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Stebbins, G. L. (1937):** The scandent species of *Prenanthes* and *Lactuca* in Africa. Bull. Jard. Bruxel. 14: 333-352.
- Tamura K., et al. (2013):** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution, 30(12): 2725-2729.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991):** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant molecular biology, 17(5): 1105-1109.
- Tavaré S. (1986):** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on mathematics in the life sciences, 17(2): 57-86.
- Timme R. E., Kuehl J. V., Boore J. L., Jansen R. K. (2007):** A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. American Journal of Botany, 94 (3): 302-312.
- Truco M. J., Antonise R., Lavelle D., Ochoa O., Kozik A., Witsenboer H., Michelmore R. W. (2007):** A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). Theoretical and applied genetics, 115(6): 735.
- Tuisi G. (1968):** Der Verwandtschaftskreis der Gattung *Lactuca* L. im iranischen Hochland und seinen Randgebieten. Selbstverlag Naturhistorisches Museum Wien, Vienna.
- Vallejos C. E. (1983):** Enzyme activity staining. In: Tanksley D. S., Orton T. J. (eds.): Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York: 469-516.
- Van de Wiel C., Arens P., Vosman B. (1999):** Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Genome 42: 139 – 149.
- Van Herwijnen, Z. O., & Manning, J. C. (2017):** A review of the history and taxonomy of the enigmatic southern African endemic wild lettuce *Lactuca dregeana* DC.(Asteraceae: Lactuceae: Lactucinae). South African Journal of Botany, 108: 352-358.

- Vermeulen A., Desprez B., Lancelin D., Bannerot H. (1994):** Relationship among *Cichorium* species and related genera as determined by analysis of mitochondrial RFLPs. *Theor. Appl. Genet*, 88: 159-166.
- Vosman B., Arens P., Rus-Kortekaas W., Smulders M. J. M. (1992):** Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 85(2): 239-244.
- Wang Z. H., Peng H., Kilian N. (2013):** Molecular phylogeny of the *Lactuca* alliance (Cichorieae subtribe Lactucinae, Asteraceae) with focus on their Chinese centre of diversity detects potential events of reticulation and chloroplast capture. *PloS one*, 8(12): e82692.
- Waycott W., Fort S. B. (1994):** Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphological analyses. *Genome*, 85: 239-244.
- Wei Z., Zhu S. X., Van den Berg R. G., Bakker F. T., Schranz M. E. (2017):** Phylogenetic relationships within *Lactuca* (*Asteraceae*), including African species, based on chloroplast DNA sequence comparisons. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(1): 55-71.
- Weising K., Nybom H., Pfenninger M., Wolff K., Kahl G. (2005):** DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC press.
- White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., Taylor J. W. (1990):** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990):** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22): 6531-6535.
- Yang Z. (2007):** PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular biology and evolution*, 24(8): 1586-1591.
- Zhang L., Su W., Tao R., Zhang W., Chen J., Wu P., Yan Ch., Jia Y., Larkin M. R., Lavelle D., Truco M. J., Reyes-Chin-Wo S., Micheltore W. R., Kuang H. (2017):** RNA sequencing provides insights into the evolution of lettuce and the regulation of flavonoid biosynthesis. *Nature Communications*.8: 2264.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Adenin
AFLP	Amplified fragment length polymorphism, polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů
AICc	Akaikeho informační kritérium
BIC	Bayesovské informační kritérium
Bp	Base pare, páry bází
C	Cytosin
DNA	Deoxyribonucleic Acid, deoxyribonukleová kyselina
F	Forward primer, primary primer
G	Guanin
ML	Maximum likelihood, metoda maximální věrohodnosti
MP	Maximum parsimony, metoda maximální úspornosti
NaCl	Chlorid sodný
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
RAPD	Random amplified polymorphic DNA, náhodně amplifikované polymorfnní části DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restričních fragmentů
SSR	Simple sequence repeat, repetice jednoduchých sekvencí
T	Thymin
TOPO6	Topoizomeráza
TRAP	Target region amplification polymorphism
U	Uracil
μl	Mikrolitr
UV	Ultrafialové světlo

7 PŘÍLOHY

Tabulka 7 Seznam haplotypů pro lokus trnL – trnF

Haplotype number	Label	Number of sequences	Length of haplotype (bp)	Sequences belonging to haplotype
1	LLF-HAP_1	1	790	<i>Chondrilla</i> _Tax_152
2	LLF-HAP_2	1	806	<i>Ixeris_sonchifolia</i> _Tax_151
3	LLF-HAP_3	2	833	<i>taraxacifolia</i> _Tax_111, Tax_184
4	LLF-HAP_4	1	784	<i>auriculata</i> _Tax_161
5	LLF-HAP_5	3	787	<i>triquerta</i> _Tax_178, Tax_179, Tax_183
6	LLF-HAP_6	3	784	<i>viminea</i> _Tax_140, Tax_118, Tax_168
7	LLF-HAP_7	1	784	<i>pseudoorientalis</i> _Tax_160
8	LLF-HAP_8	1	784	<i>acanthifolia</i> _Tax_153
9	LLF-HAP_9	2	784	<i>tetrantha</i> _Tax_147, Tax_176
10	LLF-HAP_10	1	784	<i>acanthifolia</i> _Tax_197
11	LLF-HAP_11	2	784	<i>Lactuca_sp</i> _Tax_135
				<i>tetrantha</i> _Tax_155
12	LLF-HAP_12	3	786	<i>capensis</i> _Tax_74, Tax_149
				<i>inermis</i> _Tax_105
13	LLF-HAP_13	2	786	<i>palmensis</i> _Tax_154
				<i>tenerrima</i> _Tax_92
14	LLF-HAP_14	2	789	<i>parishii</i> _Tax_195
				<i>quercina</i> _Tax_193
15	LLF-HAP_15	4	784	<i>saligna</i> _Tax_77, Tax_94, Tax_99, Tax_104
				<i>georgica</i> _Tax_109, Tax_110, Tax_119, Tax_146
16	LLF-HAP_16	12	784	<i>livida</i> _Tax_162, Tax_164
				<i>scarioloides</i> _Tax_148
17	LLF-HAP_17	14	784	<i>virosa</i> _Tax_85, Tax_86, Tax_87, Tax_91, Tax_133
				<i>aculeata</i> _Tax_98, Tax_103, Tax_125, Tax_166
18	LLF-HAP_18	18	784	<i>altaica</i> _Tax_137
				<i>dregeana</i> _Tax_02
19	LLF-HAP_19	1	782	<i>Ixeridium_dentatum</i> _Tax_09
				<i>Lactuca_sp</i> _Tax_11, Tax_12
20	LLF-HAP_20	2	789	<i>sativa</i> _Tax_124, Tax_127, Tax_139
				<i>serriola</i> _Tax_13, Tax_42
21	LLF-HAP_21	1	789	<i>aculeata</i> _Tax_100
				<i>altaica</i> _Tax_126, Tax_136, Tax_138, Tax_145
22	LLF-HAP_22	1	784	<i>dregeana</i> _Tax_03
				<i>serriola</i> _Tax_15, Tax_22, Tax_23, Tax_24, Tax_52, Tax_59, Tax_68, Tax_81, Tax_95, Tax_177, Tax_180
23	LLF-HAP_23	6	778	<i>sibirica</i> _Tax_10
				<i>tatarica</i> _Tax_96
24	LLF-HAP_24	1	782	<i>Mycelis_muralis</i> _Tax_141, Tax_167
				<i>undulata</i> _Tax_150
25	LLF-HAP_25	1	789	<i>biennis</i> _Tax_106
				<i>canadensis</i> _Tax_90, Tax_107, Tax_108
26	LLF-HAP_26	1	784	<i>floridana</i> _Tax_120
				<i>ludoviciana</i> _Tax_78, Tax_79
27	LLF-HAP_27	1	787	<i>triangulata</i> _Tax_196
				<i>sororia</i> _Tax_190
28	LLF-HAP_28	1	789	<i>takhtadzhianii</i> _Tax_191
				<i>perennis</i> _Tax_07
29	LLF-HAP_29	1	778	<i>quercina</i> _Tax_194
				<i>raddeana</i> _Tax_192
30	LLF-HAP_30	3	774	<i>indica</i> _Tax_04, Tax_06, Tax_05

Tabulka 8 Seznam haplotypu pro lokus ndhF

Haplotype number	Label	Number of sequences	Length of haplotype (bp)	Sequences belonging to haplotype
1	ndhF_HAP_1	1	2173	<i>Ixeris</i> _Tax_151
2	ndhF_HAP_2	1	2173	<i>Mycelis</i> _Tax_141,
3	ndhF_HAP_3	1	2173	<i>Mycelis</i> _Tax_167
4	ndhF_HAP_4	2	2173	<i>ludoviciana</i> _Tax_78, Tax_79 <i>Lactuca</i> _Tax_12, Tax_11 <i>aculeata</i> _Tax_100, Tax_103, Tax_125, Tax_166, Tax_98 <i>altaica</i> _Tax_126, Tax_136, Tax_137, Tax_145, Tax_145 <i>dregeana</i> _Tax_01, Tax_02, Tax_03
5	ndhF_HAP_5	29	2176	<i>sativa</i> _Tax_124, Tax_127, Tax_139 <i>serriola</i> _Tax_09, Tax_13, Tax_15, Tax_22, Tax_23, Tax_24, Tax_42, Tax_59, Tax_68, Tax_81, Tax_95 <i>sibirica</i> _Tax_10 <i>Lactuca</i> _Tax_135
6	ndhF_HAP_6	4	2176	<i>tetrantha</i> _Tax_147, Tax_176 <i>viminea</i> _Tax_18
7	ndhF_HAP_7	1	2173	<i>parishii</i> _Tax_195
8	ndhF_HAP_8	2	2176	<i>acanthifolia</i> _Tax_153, Tax_197
9	ndhF_HAP_9	2	2173	<i>biennis</i> _Tax_106_II <i>floridana</i> _Tax_120
10	ndhF_HAP_10	2	2173	<i>canadensis</i> _Tax_107, Tax_90
11	ndhF_HAP_11	1	2173	<i>capensis</i> _Tax_149,
12	ndhF_HAP_12	1	2173	<i>capensis</i> _Tax_74
13	ndhF_HAP_13	1	2173	<i>takhtadzhianii</i> _Tax_191
14	ndhF_HAP_14	4	2176	<i>georgica</i> _Tax_109, Tax_110, Tax_119, Tax_146
15	ndhF_HAP_15	1	2173	<i>Chondrilla</i> _Tax_152
16	ndhF_HAP_16	2	2173	<i>indica</i> _Tax_04, Tax_05
17	ndhF_HAP_17	1	2173	<i>indica</i> _Tax_06
18	ndhF_HAP_18	1	2173	<i>inermis</i> _Tax_105 <i>livida</i> _Tax_162, Tax_164
19	ndhF_HAP_19	6	2176	<i>virosa</i> _Tax_85, Tax_86, Tax_87, Tax_91
20	ndhF_HAP_20	1	2167	<i>perennis</i> _Tax_07
21	ndhF_HAP_21	1	2176	<i>pseudorientalis</i> _Tax_160
22	ndhF_HAP_22	2	2173	<i>quercina</i> _Tax_193, Tax_194
23	ndhF_HAP_23	1	2173	<i>raddeana</i> _Tax_192
24	ndhF_HAP_24	4	2176	<i>saligna</i> _Tax_104, Tax_77, Tax_94, Tax_99
25	ndhF_HAP_25	2	2176	<i>serriola</i> _Tax_177, Tax_180
26	ndhF_HAP_26	1	2176	<i>serriola</i> _Tax_52
27	ndhF_HAP_27	1	2188	<i>scarioloides</i> _Tax_148
28	ndhF_HAP_28	1	2173	<i>sororia</i> _Tax_190
29	ndhF_HAP_29	1	2179	<i>taraxacifolia</i> _Tax_111
30	ndhF_HAP_30	1	2173	<i>tatarica</i> _Tax_96
31	ndhF_HAP_31	1	2173	<i>tenerrima</i> _Tax_92
32	ndhF_HAP_32	1	2176	<i>tetrantha</i> _Tax_155
33	ndhF_HAP_33	1	2173	<i>triangulata</i> _Tax_196
34	ndhF_HAP_34	3	2173	<i>triquerta</i> _Tax_17, Tax_178, Tax_179
35	ndhF_HAP_35	1	2173	<i>triquerta</i> _Tax_183
36	ndhF_HAP_36	1	2173	<i>undulata</i> _Tax_150 <i>viminea</i> _Tax_118, Tax_140, Tax_168
37	ndhF_HAP_37	1	2176	<i>viminea</i> _Tax_140, Tax_168
38	ndhF_HAP_38	2	2176	<i>viminea</i> _Tax_140, Tax_168
39	ndhF_HAP_39	1	2176	<i>virosa</i> _Tax_133

Tabulka 9 Seznam ribotypů pro lokus ITS

Haplotype number	Label	Number of sequences	Length of haplotype (bp)	Sequences belonging to haplotype
1	ITS_1	1	639	<i>acanthifolia</i> _Tax_153
2	ITS_2	1	639	<i>acanthifolia</i> _Tax_197
3	ITS_3	6	639	<i>aculeata</i> _Tax_100, Tax_103, Tax_125, Tax_166, Tax_98 <i>altaica</i> _Tax_126
4	ITS_4	20	639	<i>altaica</i> _Tax_136, Tax_137, Tax_138, Tax_145 <i>dregeana</i> _Tax_01, Tax_02, Tax_03 <i>Lactuca</i> _sp_Tax_11, Tax_12 <i>sativa</i> _Tax_124 <i>serriola</i> _Tax_15, Tax_22, Tax_24, Tax_42, Tax_52, Tax_59, Tax_68, Tax_81, Tax_95 <i>sibirica</i> _Tax_10
5	ITS_5	1	638	<i>auriculata</i> _Tax_161
6	ITS_6	1	640	<i>biennis</i> _Tax_106
7	ITS_7	4	640	<i>canadensis</i> _Tax_107, Tax_108 <i>ludoviciana</i> _Tax_78, Tax_79
8	ITS_8	1	640	<i>canadensis</i> _Tax_90
9	ITS_9	1	626	<i>capensis</i> _Tax_149
10	ITS_10	1	626	<i>capensis</i> _Tax_74
11	ITS_11	1	642	<i>Chondrilla</i> _Tax_152
12	ITS_12	1	638	<i>floridana</i> _Tax_120
13	ITS_13	2	639	<i>georgica</i> _Tax_109, Tax_119
14	ITS_14	2	639	<i>georgica</i> _Tax_110, Tax_146
15	ITS_15	2	640	<i>indica</i> _Tax_04, Tax_05
16	ITS_16	1	640	<i>indica</i> _Tax_06
17	ITS_17	1	626	<i>inermis</i> _Tax_105
18	ITS_18	1	639	<i>Ixeris_sonchifolia</i> _Tax_151
19	ITS_19	1	641	<i>Lactuca_takhtadzhianii</i> _Tax_191
20	ITS_20	1	639	<i>Lactuca</i> _sp_Tax_135
21	ITS_21	2	639	<i>livida</i> _Tax_162, Tax_164
22	ITS_22	2	640	<i>Mycelis_muralis</i> _Tax_141, Tax_167
23	ITS_23	1	626	<i>palmensis</i> _Tax_154
24	ITS_24	2	640	<i>parishii</i> _Tax_195 <i>quercina</i> _Tax_193
25	ITS_25	1	639	<i>perennis</i> _Tax_07
26	ITS_26	1	639	<i>pseudoorientalis</i> _Tax_160
27	ITS_27	2	640	<i>quercina</i> _Tax_194 <i>raddeana</i> _Tax_192
28	ITS_28	1	639	<i>saligna</i> _Tax_104
29	ITS_29	1	639	<i>saligna</i> _Tax_77
30	ITS_30	1	639	<i>saligna</i> _Tax_94
31	ITS_31	1	639	<i>saligna</i> _Tax_99
32	ITS_32	1	639	<i>sativa</i> _TAX_127
33	ITS_33	1	639	<i>sativa</i> _Tax_139
34	ITS_34	1	640	<i>scarioloides</i> _Tax_148
35	ITS_35	1	639	<i>serriola</i> _Tax_09
36	ITS_36	1	639	<i>serriola</i> _Tax_13
37	ITS_37	2	639	<i>serriola</i> _Tax_177, Tax_180
38	ITS_38	1	639	<i>serriola</i> _Tax_23
39	ITS_39	1	642	<i>sororia</i> _Tax_190
40	ITS_40	2	637	<i>taraxacifolia</i> _Tax_111, Tax_184
41	ITS_41	1	643	<i>tatarica</i> _Tax_96
42	ITS_42	1	626	<i>tenerrima</i> _Tax_92
43	ITS_43	3	639	<i>tetrantha</i> _Tax_147, Tax_176 <i>viminea</i> _Tax_18
44	ITS_44	1	641	<i>triangulata</i> _Tax_196
45	ITS_45	1	640	<i>triquerta</i> _Tax_178
46	ITS_46	1	640	<i>triquerta</i> _Tax_179
47	ITS_47	1	640	<i>triquerta</i> _Tax_183
48	ITS_48	1	639	<i>undulata</i> _Tax_150
49	ITS_49	1	639	<i>viminea</i> _Tax_118
50	ITS_50	1	639	<i>viminea</i> _Tax_140
51	ITS_51	1	639	<i>viminea</i> _Tax_168
52	ITS_52	5	639	<i>virosa</i> _Tax_133, Tax_85, Tax_86, Tax_87, Tax_91

Tabulka 10 Seznam vzorků stažených z databáze GenBank a počet jedinců

Zkratka	Druh	Počet jedinců
AJ633331.1, AJ633332.1, HQ172902.1, KU586730.1, KT249919.1, KT249882.1, KT249853.1, KT249815.1, KT249814.1, KT249813.1, KT249811.1, KT249809.1, KT249806.1, AB742457.1., AB742456.1, KT249805.1, LT721932.1, KT249808.1, AB742455.1, KT249804.1, KT249807.1, KT249810.1, KT249812.1, KT249879.1, KT249804.1, KT249807.1, KT249810.1, KT249812.1, KT249879.1	<i>Lactuca serriola</i>	29
L13957.1, L13957.1, AY504693.1, KT249802.1, AJ633337.1, KU586729.1, KT249801.1	<i>Lactuca sativa</i> L.	7
KT249803.1	<i>Lactuca sativa</i> var <i>capitata</i> L.	1
LT722049.1	<i>Lactuca georgica</i> Crossh.	1
AJ633335.1, KU586734.1, LT722056.1	<i>Lactuca virosa</i> Habl.	3
AJ633336.1, HQ161960.1, KU586728.1, LT721966.1	<i>Lactuca salina</i> L.	4
LT722048.1	<i>Lactuca quercina</i> L.	1
LT721985.1, LT722057.1	<i>Lactuca tatarica</i> (L.), C. A. Mey.	2
AJ633341.1	<i>Sonchus sibiricus</i> L.	1
KC968085.1, KC968086.1, KC968053.1, KC968087.1, KC968054.1, KC968055.1, KC968051.1, KC968052.1, LT722027.1, AY862579.1, LT721993.1, AY862579.1, LT721993.1, LT722027.1	<i>Lactuca indica</i> L.	14
KT249885.1, KT249887.1, KT249885.1, KT249887.1	<i>Lactuca indica</i> var <i>laciniata</i> Hara.	2
LT721959.1, LT722034.1	<i>Cicerbita macrophylla</i> (Willd.) Wallr.	2
LT722053.1, LT722036.1, AJ633326.1	<i>Cicerbita racemosa</i> (Willd.) Beauverd.	3
KU586731.1	<i>Lactuca sibirica</i> (L.) Benth. ex Maxim.	1
KU586733.1, AJ633333.1	<i>Lactuca viminea</i> (L.) J.Presl & C.Presl.	2
LT722051.1	<i>Lactuca tetrantha</i> B.L.Burt & P.H.Davis.	1
LT721981.1	<i>Lactuca alpestris</i> (Gand.) Rech.f.	1
LT722007.1	<i>Lactuca acanthifolia</i> (Willd.) Boiss.	1
KF739606.1	<i>Pterocypselia elata</i> (Hemsl.) C.Shih.	1
LT721938.1	<i>Lactuca inermis</i> Forssk.	1
LT722001.1, LT722001.1, KU586732.1	<i>Lactuca tenerima</i> Pourr.	3
LT721976.1	<i>Lactuca inermis</i>	1
LT721994.1	<i>Lactuca picridiformis</i> Boiss.	1
LT722012.1, LT722005.1, LT721940.1	<i>Lactuca tuberosa</i> Jacq.	3
AJ633334.1, LT721987.1	<i>Lactuca perennis</i> L.	1
LT721930.1, LT722025.1	<i>Lactuca intricata</i> Boiss.	2
LT721998.1	<i>Lactuca glaucifolia</i> Boiss.	1
KU586721.1, AJ633325.1	<i>Cicerbita plumieri</i> (L.) Kirschl.	2
LT721964.1	<i>Lactuca plumieri</i> (L.) Gren. & Godr.	1
HQ161957.1, KP828827.1, LT722010.1	<i>Lactuca floridana</i> (L.) Gaertn.	3
HQ161959.1, KP828828.1	<i>Lactuca biennis</i> (Moench) Fernald.	2
HQ172901.1	<i>Lactuca hirsuta</i> Muhl. ex Nutt.	1
KP828830.1, HQ161958.1	<i>Lactuca graminifolia</i> Michx.	2
HQ161956.1, KP828829.1, GU818575.1	<i>Lactuca canadensis</i>	3
LT722044.1, LT722037.1.	<i>Lactuca variabilis</i> Bornm.	2
LT722039.1	<i>Lactuca aurea</i> (Sch.Bip. ex Vis. & Pancić) Stebbins.	1
LT721937.1	<i>Cicerbita deltoidea</i> (M.Bieb.) Beauverd.	1
LT721953.1	<i>Lactuca oyukludaghensis</i> (Parolly) N.Kilian & Parolly.	1
LT721988.1, LT722017.1	<i>Lactuca glareosa</i> Boiss.	2
LT721948.1, LT722015.1	<i>Cicerbita pancicii</i> (Vis.) Beauverd.	2
LT722026.1	<i>Cicerbita petiolata</i> (K.Koch) Gagnidze.	1
AJ633340.1, KU586720.1, AJ633324.1, LT721978.1	<i>Cicerbita alpina</i> (L.) Wallr.	4
LT722035.1, LT721939.1	<i>Cicerbita hispida</i> Beauverd	2
LT721971.1	<i>Cephalorrhynchus subplumosus</i> Kovalevsk.	1
LT721958.1	<i>Cephalorrhynchus microcephalus</i> DC.	1
LT722040.1	<i>Cephalorrhynchus kirpicznikovii</i> Grossh.	1
AJ633338.1	<i>Mycelis muralis</i>	1
LT722055.1, KU586737.1	<i>Lactuca muralis</i> (L.) Fresen.	2
LT722009.1	<i>Cicerbita roborowskii</i> (Maxim.) Beauverd	1
LT722033.1	<i>Lactuca alaica</i> Kovalevsk.	1
LT721920.1	<i>Lactuca mira</i> Pavlov	1
LT722030.1, LT721972.1, LT721924.1	<i>Kovalevskiella zeravschamica</i> (Popov ex Kovalevsk.) Kamelin	3
LT721945.1, LT721982.1	<i>Kovalevskiella kovalevskiana</i> (Kirp.) Kamelin	2
LT721980.1, LT721989.1	<i>Kovalevskiella rosea</i> (Popov & Vved.) Kamelin	2
KF739620.1	<i>Faberia tibetica</i> (Franch.) Beauverd	1
KF739619.1	<i>Faberia faberi</i> (Hemsl.) N. Kilian, Z.-Huan Wang & J.W. Zhang	1
KF739615.1, KF739616.1	<i>Faberia nanchuanensis</i> C.Shih	2
EU046560.1, LT722038.1	<i>Notoseris macilenta</i> (Vaniot & H. Lév.) N. Kilian	2
EU436698.1	<i>Notoseris triflora</i> (Hemsl.) C.Shih	1
LT722002.1	x <i>Notoseris khasiana</i> (C.B. Clarke) N. Kilian	1
LT722011.1	<i>Notoseris scandens</i> (Hook. f.) N. Kilian	1
KF739610.1	<i>Paraprenanthes triflora</i> C.Shih	1
LT722024.1	<i>Paraprenanthes diversifolia</i> (Vaniot) N. Kilian	1
KF739609.1	<i>Paraprenanthes yunnanensis</i> (Franch.) C.Shih	1
LT721923.1, LT721955.1	<i>Notoseris psilolepis</i> C.Shih	2
LT721935.1, LT721941.1, LT721975.1	<i>Melanoseris souliei</i> (Franch.) N. Kilian	3
LT721968.1	<i>Lactuca praecox</i> R.E.Fr.	1
LT722008.1	<i>Lactuca calophylla</i> C.Jeffrey	1
LT721969.1	<i>Lactuca lasiorhiza</i> (O.Hoffm.) C.Jeffrey	1
LT721983.1	<i>Lactuca ugandensis</i> C.Jeffrey	1
LT721967.1	<i>Lactuca schulzeana</i> Büttner	1
LT721957.1	<i>Lactuca setosa</i> Stebbins ex C.Jeffrey	1
LT722003.1, LT722029.1, LT721942.1, LT721952.1	<i>Lactuca paradoxa</i> Sch.Bip. ex A.Rich.	1
	<i>Cephalorrhynchus kossinskyi</i> (Krasch.) Kirp.	4

Tabulka 10 - pokračování

Zkratka	Druh	Počet jedinců
LT721984.1	<i>Lactuca attenuata</i> Stebbins	1
LT722006.1, LT722042.1	<i>Melanoseris bracteata</i> (Hook. f. & Thomson ex C.B. Clarke) N. Kilian	2
LT721944.1	<i>Steptorhamphus crassicaulis</i> (Trautv.) Kirp.	1
LT721965.1	<i>Melanoseris violifolia</i> (Decne.) N. Kilian	1
LT722052.1	<i>Melanoseris macrorhiza</i> (Royle) N. Kilian	1
LT721950.1	<i>Melanoseris monocephala</i>	1
LT722004.1	<i>Melanoseris likiangensis</i> (Franch.) N. Kilian	1
LT721949.1	<i>Melanoseris tenuis</i> (C. Shih) N. Kilian	1
LT721991.1, LT721992.1	<i>Melanoseris graciliflora</i> (DC.) N. Kilian	2
LT721986.1, LT721990.1	<i>Melanoseris cyanea</i> Edgew.	2
LT722023.1	<i>Melanoseris brunoniana</i> Wall. ex DC.	1
LT722028.1	<i>Melanoseris decipiens</i> (C. B. Cl.) N. Kilian & Ze H. Wang	1
LT721922.1	<i>Lactuca hazaranensis</i> Djavadi & N. Kilian	1
LT722000.1	<i>Lactuca rosularis</i> Boiss.	1
LT722045.1	<i>Steptorhamphus pumilus</i> (Rech.f. & Tuisl) Tuisl	1
LT721954.1, LT721974.1	<i>Cicerbita thianschanica</i> (Regel & Schmalh.) Beauverd	2
LT721926.1, LT722043.1, LT721933.1	<i>Cephalorrhynchus soongoricus</i> (Regel) Kovalevsk.	3
LT721928.1, LT721951.1, LT721927.1	<i>Melanoseris polyclada</i> (Boiss)	3
LT722021.1	<i>Lactuca bourgaei</i> (Boiss.) Irish & N. Taylor	1
AJ633329.1	<i>Cicerbita bourgaei</i> (Boiss) Beauverd	1
LT721960.1	<i>Cicerbita prenanthoides</i> (M. Bieb.) Beauverd	1
LT721996.1	<i>Cephalorrhynchus takhtadzhianii</i> (Sosn.) Kirp.	1
LT721929.1, LT721931.1, LT721943.1	<i>Cephalorrhynchus brassicifolius</i> (Boiss.) Tuisl	3
LT721962.1, LT721961.1, LT721970.1, LT721973.1	<i>Lactuca triquetra</i> (Labill.) Boiss.	4
LT721997.1	<i>Hypochaeris maculata</i> L.	1
LT721977.1	<i>Hypochaeris radista</i> L.	1
LT721934.1	<i>Lagoseriopsis popovii</i> (Krasch.) Krip.	1
LT721925.1	<i>Sonchella dentata</i> (Ledeb.) Sennikov	1
AJ633327.1, AJ633328.1	<i>Cicerbita thianschanica</i> (Regel & Schmalh.)	2
LT721947.1	<i>Dubyaea hispida</i> (D. Don) DC.	1
LT721919.1	<i>Soroseris glomerata</i> (Decne.) Stebbins	1
LT722014.1	<i>Nabalis trifoliolatus</i> Cass.	1
LT721999.1	<i>Crepidiastrum tenuifolium</i> (Willd.) Sennikov	1
LT722018.1	<i>Ixeris chinensis</i> subsp. <i>versicolor</i> (Fisch. ex Link) Kitam.	1
LT722046.1	<i>Youngia cineripappa</i> (Babc.) Babc. & Stebbins	1
LT722020.1	<i>Crepis sancta</i> (L.) Bornm.	1
LT722031.1	<i>Nabalis tatarinowii</i> (Maxim.) Nakai	1

Seznam 1 Použité přístroje a laboratorní vybavení

Centrifuga Eppendorf® 5804 R (Eppendorf, DE)

Digestoř (Merci, CZ)

Dokumentační systém Fire-Reader V4 (UVITEC, UK)

Elektroforéza OWL A6; Easy Cast OWL B1 (Fisher Thermo Scientific, USA)

Flowbox PV-100 (Telstar, ES)

Homogenizátor Fastprep® 24 (MP Biomedical, FR)

Laboratorní váha PM 2000 (Mettler-Toledo, USA)

Mastercycler nexus (Eppendorf, DE)

Mikropipety Eppendorf, 0.1 – 1000 µl (Eppendorf, DE)

Spektrometr NanoDrop 2000 (Fisher Thermo Scientific, USA)

Sušárna (Chirana, SK)

Termální cycler Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, DE)

Termomixer Mixing Block MB-102 (Bioer, CN)

Vortex MS2 mini; MS3 basic (IKA, DE)

Výrobník ledu (Bar Line, IT)

Seznam 2 Použité chemikálie a roztoky

Agaróza (Sigma-Aldrich, USA)

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctova (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol (LachNer, CZ)

H₃BO₃ = kys. boritá (LachNer, CZ)

Interkalační DNA barvivo GelRed (Biotum, USA)

KAPA Taq PCR Kit (Kapabiosystems, USA)

PEG = polyethylenglykol (Sigma-Aldrich, USA)

NaCl = chlorid sodný (LachNer, CZ)

TRIS = trishydroxymethylaminomethan (VWR Life Science, UK)

Zásobní roztok 10X TBE pufru (55 g H₃BO₃, 108 g TRIS bylo rozpuštěno v destilované vodě, bylo přidáno 40 ml 0,5M EDTA (pH 8) a doplněno do výsledného objemu 1L a sterilizováno filtrací pomocí membránového filtru Millipore [22 µm])