

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Genetická variabilita pracovní kolekce genových
zdrojů *Lactuca aculeata*

Diplomová práce

Autor: Eliška Sahajová
Studijní program: N1407 Chemie
Studijní obor: Učitelství chemie a biologie pro střední školy
Forma studia: Prezenční
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

OLOMOUC 2015

„Genetická variabilita pracovní kolekce genových zdrojů *Lactuca aculeata*.“

„Genetic variability of *Lactuca aculeata* germplasm working collection.“

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma *Genetická variabilita pracovní kolekce genových zdrojů Lactuca aculeata* vypracovala samostatně pod vedením *RNDr. Miloslava Kitnera, Ph.D.* za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Eliška Sahajová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali při psaní této diplomové práce. Především vedoucímu diplomové práce *RNDr. Miloslavu Kitnerovi, Ph.D.* za jeho cenné rady, trpělivost při vypracovávání zadaného tématu.

Dále bych vyjádřila vděčnost *Mgr. Michaele Jemelkové* za její pomoc při práci v laboratoři, při interpretaci získaných výsledků a korekturách textu.

Děkuji i *doc. Ing. Evě Křístkové, Ph.D.* a *RNDr. Ivaně Doležalové, Ph.D.* za jejich připomínky, které přispěly ke zvýšení kvality této práce. Celá práce byla realizována díky projektům interní grantové agentury UP v Olomouci PrF-2013-003, IGA_PrF_2014001, IGA_PrF_2015_001.

Poděkování samozřejmě patří také mým *rodičům a manželovi*, kteří mě po celou dobu studia podporovali. A v neposlední řadě děkuji i *svým dětem*, které, ač nevědomky, byly mou hnací silou během celého magisterského studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Eliška Sahajová
Název práce:	Genetická variabilita pracovní kolekce genových zdrojů <i>Lactuca aculeata</i>
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra botaniky PřF UP, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc
Vedoucí práce:	RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.
Rok obhajoby:	2015

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá studiem genetické variability 72 položek *Lactuca aculeata* pocházejících z Turecka, Jordánska a Izraele (Beharav et al., 2010a) a tří položek *L. serriola* původem z Jordánska. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí sedmi AFLP primerových kombinací a zároveň pomocí 8 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Vzájemné vztahy mezi analyzovanými vzorky byly vizualizovány pomocí dvou přístupů, NeighbourNetwork diagramu a Bayesovské shlukovací analýzy. Rovněž byly pro jednotlivé populace spočítány základní indexy genetické variability. Pomocí NeighborNetwork diagramu se potvrdila dřívější determinace vzorků *L. aculeata*, *L. serriola* a také třech hybridních vzorků *L. aculeata* × *L. serriola* (Lebeda et al., 2012). Dále se podařilo nově detekovat nejméně 6 dalších vzorků, které vykazovaly taktéž podobnost s genotypovými profily *L. serriola*, což může poukazovat na mezidruhovou hybridizaci mezi oběma druhy. Výše uvedené rozdělení bylo potvrzeno i pomocí Bayesovské analýzy, kde se jasně vyčlenily turecké vzorky vykazující odlišný genetický charakter, než byl zjištěný u vzorků pocházejících z Jordánska a Izraele. Vzorky původem z Jordánska a Izraele vykazovaly podobný genetický charakter, což může poukazovat na možný *gene flow* mezi populacemi.

Klíčová slova: *Lactuca aculeata*, molekulární analýza, AFLP, mikrosatelity, genetická variabilita

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Eliška Sahajová
Title: Genetic variability of *Lactuca aculeata* germplasm working collection
Type of thesis: Master's thesis
Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
Supervisor: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.
The year of presentation: 2015

Abstract:

This Master's Thesis is focused on study of genetic variability of seventy two *Lactuca aculeata* accessions coming from Turkey, Jordan and Israel (Beharav et al., 2010a) and three accessions of *Lactuca serriola* originally from Jordan. These samples were analyzed by seven AFLP primer combinations and also by eight polymorphic microsatellite loci. Mutual relationships among the analyzed samples were visualized using two approaches, NeighbourNetwork diagram and Bayesian clustering method. The basic genetic variability indices were calculated too. Based on NeighborNetwork the earlier morphological determination of samples *L. aculeata*, *L. serriola* and three putative hybrids *L. aculeata* × *L. serriola* (Lebeda et al., 2012) was confirmed. Moreover I was able to detect at least 6 additional hybrid samples showing certain proportion of *Lactuca serriola*-like genotype. This fact indicates the interspecific hybridization between these two species. The Bayesian clustering analysis confirmed above mentioned distribution of the samples too, where the samples from Turkey showed different genetic character than samples from Jordan and Israel. Samples coming from Jordan and Israel showed same genetic character. It suggests to possible *gene flow* between populations.

Keywords: *Lactuca aculeata*, molecular analysis, AFLP, microsatellites, genetic variability

Number of pages: 72

Number of appendices: 1

Language: Czech

OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍLE PRÁCE.....	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Charakteristika, geografické rozšíření a ekologie rodu <i>Lactuca</i> L.	10
3.2 Charakteristika druhu <i>L. aculeata</i>	11
3.2.1 Taxonomické zařazení	11
3.2.2 Morfologická charakteristika	12
3.2.3 Ekogeografická charakteristika	13
3.2.4 Využití <i>L. aculeata</i> při šlechtění kulturního salátu.....	13
3.3 Genetické markery používané při studiu rodu <i>Lactuca</i> L.....	16
3.3.1 DNA markery	16
3.3.1.1 Metody založené na restrikčním štěpení a hybridizaci.....	17
3.3.1.1.1 RFLP.....	17
3.3.1.2 Metody založené na PCR amplifikaci	18
3.3.1.2.1 PCR.....	18
3.3.1.2.2 Mikrosatelity	19
3.3.1.2.3 AFLP	23
3.3.1.2.4 RAPD.....	26
3.3.1.2.5 TRAP	26
3.3.1.2.6 Sekvenování.....	27
4 MATERIÁL A METODY	29
4.1 Použité chemikálie	29
4.2 Použité přístroje a laboratorní vybavení	30
4.3 Použité roztoky	31
4.4 Rostlinný materiál.....	32
4.4.1 Původ rostlinného materiálu.....	32
4.4.2 Kultivace rostlinného materiálu	35
4.4.3 Izolace genomické DNA	36
4.5 AFLP analýza.....	37
4.5.1 Restrikce a ligace DNA.....	37
4.5.2 Preselektivní amplifikace	38
4.5.3 Selektivní amplifikace.....	39

4.6 Mikrosatelity	41
4.6.1 Podmínky PCR reakce u mikrosatelitních markerů	42
4.7 Separace a detekce PCR produktů	43
4.8 Statistické hodnocení	45
4.8.1 Vyhodnocení gelů	45
4.8.2 Analýza dat	46
4.8.3 Vizualizace genetické struktury	46
5 VÝSLEDKY	48
5.1 AFLP analýza	48
5.2 SSR analýza	50
5.3 Vizualizace vzájemných vztahů mezi analyzovanými vzorky	53
6 DISKUZE	57
7 ZÁVĚR	61
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	61
9 LITERATURA	64
10 PŘÍLOHY	71

1 ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá studiem genetické variability přirozených populací *L. aculeata*. Studované populace pocházely z oblasti Blízkého východu (Izrael, Jordánsko a Turecko), který je považován za centrum původu a diverzity studovaného druhu. Současné studie naznačují, že právě *L. aculeata* by mohla tvořit další zdroj genů pro šlechtění kulturního salátu (*L. sativa* L.), zejména pro rezistenci vůči chorobám, škůdcům a dalším faktorům, které dnes ohrožují moderní kultivary salátu. Ačkoliv *L. aculeata* představuje jeden z potenciálních zdrojů genů rezistence *L. sativa* k výše uvedeným faktorům, jsou informace o genetické variabilitě tohoto druhu neúplné.

Jako hlavní metodické nástroje budou v této diplomové práci použity AFLP a mikrosatelitní markery publikované pro blíže příbuzné druhy (*L. serriola* a *L. saligna*). Tyto molekulární markery představují užitečný nástroj k posouzení rozdělení genetické informace uvnitř i mezi populacemi. Právě dobrá znalost genetické struktury zvyšuje možnost případného využití *L. aculeata* ve šlechtění kulturního salátu (*L. sativa*).

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Zpracování literární rešerše současného stavu problematiky využití molekulárních markerů při studiu genetické variability přírodních populací a genofondových kolekcí planých progenitorů *Lactuca sativa*.
- 2) Provedení analýzy genetické variability pracovní kolekce genových zdrojů *Lactuca aculeata* pomocí mikrosatelitních (3-5 markerů) a AFLP (cca 200 lokusů) markerů.
- 3) Statistické zhodnocení dat – výpočty základních indexů genetické variability, vizualizace vzájemných vztahů mezi analyzovanými vzorky.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika, geografické rozšíření a ekologie rodu *Lactuca* L.

Studovaný druh *L. aculeata* patří do jedné z druhově nejbohatších čeledí cévnatých rostlin Asteraceae (hvězdnicovité), podčeledi Cichorioideae (čekankové), tribu Cichorieae (= Lactucaeae) a rodu *Lactuca* (Bremer et al., 1994). Tento rod zahrnuje jednoleté, dvouleté nebo vytrvalé byliny či keře, které mají ve svých pletivech specializované buňky (tzv. mléčnice) produkující latex. Z nejdůležitějších znaků charakterizující tento rod můžeme jmenovat válcovitý zákrov s několika řadami přímých a tuhých nebo nazpět obrácených zákrovních listenů, ploché lůžko bez plevok (drobný listen jednotlivých květů v úboru), nápadně dlouhé chlupy na ramenech čnělky, homomorfické a lehce zploštělé nažky s mnoha žebry se zobánkem (vzácně bez zobánku). Chmýr je bílý, nažloutlý nebo hnědý s mnoha jemnými a na povrchu hladkými nebo drsnými štětinami obvykle bez vnějších velmi krátkých měkkých chlupů (Dostál, 1989; Doležalová, 2002b; Lebeda et al., 2004).

Rod *Lactuca* zahrnuje okolo 120 planých druhů (16 se vyskytuje v Evropě, 51 v Asii, 43 v Africe a 12 v Americe) (Lebeda et al., 2001) a člení se do sedmi sekcí; *Lactuca* (subsekcce *Lactuca* a *Cyanicae*), *Phoenixopus*, *Mulgedium*, *Lactucopsis*, *Tuberosae*, *Micranthae* a *Sororiae* (Feráková, 1977; Rulkens, 1987; Lebeda, 1998) a do dvou geografických skupin – africké a severoamerické. Většina druhů tohoto rodu jsou xerofyty dobře adaptované na suché klimatické podmínky (Lebeda et al., 2004) vyskytující se převážně v mírném a teplém pásu severní polokoule (Evropa, Asie, Indonésie, Severní a Střední Amerika, Afrika) (Lebeda and Astley, 1999), s optimální nadmořskou výškou 200 – 600 m, výjimku tvoří endemicky se vyskytující druhy liánovitěho typu v horách střední Afriky (Feráková, 1977; Lebeda et al., 2004) či druhy tropických a subtropických deštných pralesů východní Afriky a Madagaskaru rostoucích v nadmořské výšce 2100 – 2700 m (Jeffrey, 1966).

Z ekologického hlediska je rod *Lactuca* velmi variabilní a jeho druhy osídlují nejrůznější typy biotopů. Nejběžnější evropské druhy (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*) jsou synantropní (ruderální), osídlující disturbované stanoviště (r-strategie). Nejčastěji rostou zejména podél cest, železnic či v příkopech (Lebeda et al. 2001). Druhy jako např. *L. aurea*, *L. quercina*, *L. biennis*, *L. sibirica* jsou součástí lesních společenstev (Nessler, 1976; Feráková, 1977). Z kalcifilních druhů rostoucích na skalních svazích můžeme jmenovat *L. graeca*, *L. tenerrima*, *L. viminea*, *L. perennis* (Lopez and Jimenez, 1974; Feráková, 1977). Druhem osídlující pobřežní útesy je *L. acanthifolia*.

Druh *L. tatarica* roste na zasolených a na živiny chudých substrátech v semiaridních chladných oblastech (Feráková, 1977; Lebeda et al., 2001).

3.2 Charakteristika druhu *L. aculeata*

3.2.1 Taxonomické zařazení

Zařazení druhu *L. aculeata* Boiss et Kotschy do systému podle Integrated Taxonomic Information System (ITIS).

Říše: *Plantae*

Podříše: *Viridiplantae*

Oddělení: *Tracheophyta*

Třída: *Magnoliopsida*

Řád: *Asterales*

Čeleď: *Asteraceae*

Podčeleď: *Cichorioideae*

Kmen: *Cichorieae* (= *Lactuceae*)

Podkmen: *Lactucianae*

Rod: *Lactuca* L.

Sekce: *Lactuca* L.

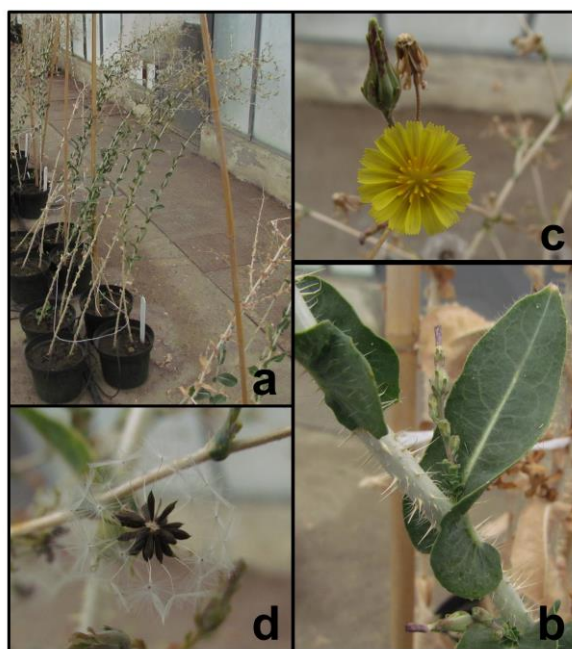
Podsekce: *Lactuca* L.

Druh: *Lactuca aculeata* Boiss. et Ky.

3.2.2 Morfologická charakteristika

Lactuca aculeata Boiss. et Ky. je diploidní, autogamní druh s $2n = 2x = 18$ chromozomů. Je to jednoletá až dvouletá velmi statná bylina, vysoká přibližně 100 cm. Stříbřitě-bílá lodyha je přímá, porostlá rovnými pichlavými trichomy. Listy *L. aculeata* mají sukulentní charakter. Jsou šedivé, na adaxiální a abaxiální straně jsou hustě porostlé trichomy, které jsou přítomny i na střední žilce na spodní straně listu. Listy jsou přisedlé, nedělené až peřenosečné, se zubatým okrajem. Střední lodyžní listy měří 3-9 x 1,5-3,5 cm a jsou s ouškou, která jsou malá a zaoblená. Květenství tvoří volná, válcovitá lata s mnoha úbory. Úbory jsou jednotlivé, boční i terminální, stopky úborů s krycími i žlaznatými trichomy, listeny jsou lysé. Zákrov 6-10 mm, ve zralosti poněkud delší, je 3 až 4-řadý. Jazykovité květy jsou žluté. Nažky 5-7 mm jsou středně hnědé s mnoha žebry, s nápadnými bílými trichomy a světlým 4-5 mm dlouhým zobánkem. Bílý chmýr je dlouhý 3-5 mm (Jeffrey, 1995). Vegetativní fáze u *L. aculeata* probíhá v červnu, kdy se maximální teploty pohybují v rozmezí 28,7 °C až 34,4 °C. Zatímco reprodukční fáze probíhá v srpnu, kdy průměrné denní teploty dosahují průměrné hodnoty 28,7 °C (Beharav et al., 2010a).

Obrázek 1. *Lactuca aculeata*. a – celkový vzhled rostliny, b - detail robustního stonku s výraznými trichomy, které jsou pro tento druh charakteristické, c – detail květenství (úboru), d – detail plodenství nažek s chmýrem (Foto: Mgr. Michaela Jemelková).



3.2.3 Ekogeografická charakteristika

Lactuca aculeata je druhem s preferencí suchých klimatických podmínek, jehož výskyt je omezen na oblast Blízkého východu a Anatolijské náhorní plošiny (Zohary, 1991; Jeffrey, 1975), kde roste v nadmořské výšce od 222 až do 968 m. n. m. V severním Izraeli můžeme tento druh nalézt v oblasti Golanských výšin, ovšem s výjimkou okolí hory Mt. Hermon (Beharav et al., 2010a), kde roste ve společenstvech dalších zástupců rodu *Lactuca*, především *L. serriola* a *L. saligna* (Zohary, 1991). Jejich blízké vztahy byly potvrzené mnoha případy spontánní hybridizace v jejich přirozeném prostředí (Zohary, 1991) a některými metodami DNA markerů (Beharav et al., 2010a). Zohary (1991) považuje Izrael za jedno z možných genových center kulturního hlávkového salátu (*L. sativa* L.), s nímž je *L. aculeata* plně křížitelná (Globerson et al., 1980).

Lactuca aculeata osídluje různé typy biotopů (Beharav et al., 2010a), nejčastěji se vyskytuje na stepích, skalách, případně i na neobdělávaných polích (Jeffrey, 1975). Mezi charakteristické lokality patří okraje silnic, polní cesty, antropogenní a ruderální stanoviště. Podkladovou horninou, na které *L. aculeata* roste, bývá zpravidla čedič.

3.2.4 Využití *L. aculeata* při šlechtění kulturního salátu

Jeden z trendů současného šlechtění kulturního salátu (*L. sativa* L.), který patří mezi nejdůležitější a nejrozšířenější listovou zeleninu na světě (Lebeda et al., 2007a; Mou, 2008), je založen na využití jeho planě rostoucích příbuzných druhů a progenitorů. Z celkového počtu asi 100 druhů rodu *Lactuca* je ve světových kolekcích genových bank zastoupeno pouze 22 druhů (Lebeda and Astley, 1999), proto je v současnosti vyvíjeno velké úsilí a je publikována řada studií týkajících se planých progenitorů kulturního salátu, které tvoří tzv. genový pool *L. sativa* (Lebeda et al., 2014).

Genový pool (genepool) je definován jako souhrn genů a jejich kombinací, které je možné využít ke zlepšování vlastností šlechtěné rostliny (Lebeda et al., 2007a), udává množství jednotlivých unikátních alel v rámci druhu nebo populace. Z tohoto hlediska jsou genové pooly nenahraditelné a jsou rozhodující nejen pro další šlechtění zemědělských plodin, ale i pro zachování a rozšíření druhové a odrůdové diverzity a omezování negativních vlivů zemědělství na životní prostředí (Salaš, 2003).

Harlan and de Wet (1971) navrhli tři skupiny genových poolů, které jsou stanoveny na základě vztahu v rámci křížení mezi vyšlechtěnou rostlinou a jejími příbuznými planě rostoucími druhy. Jedná se o primární (GP-1), sekundární (GP-2) a terciární (GP-3) genetický pool.

Do skupiny primárního genového poolu pěstovaného salátu (*L. sativa*) náleží jeho primitivní formy a odrůdy a také planě rostoucí druhy (např. *L. serriola*, *L. aculeata*, *L. altaica*, *L. dregeana*, aj.), které jsou sexuálně kompatibilní s *L. sativa* (Lebeda et al., 2007a) bez bariér křížitelnosti a vyznačující se snadným přenosem genů za vzniku fertálních potomků.

Sekundární genový pool je reprezentován planými druhy, které si mohou vyměňovat geny pouze v určité míře. McGuire et al. (1993) a Zohary (1991) do této skupiny řadí druh *L. saligna*, který hraje důležitou roli v rezistenci *L. sativa* proti plísni salátové (*Bremia lactucae*) (Beharav et al., 2006; Lebeda et al., 2007a).

Kvůli složitým bariérám v křížení řadíme do terciárního poolu plané druhy jako jsou *L. virosa*, *L. acanthifolia*, *L. aurea*, *L. tatarica*, *L. viminea* aj., u kterých je přenos genů mimořádně obtížný a vyžaduje speciální techniky (Chloupek, 1995; Dotlačil, 1996). Lebeda et al. (2007a) uvádí, že postavení *L. saligna* a *L. virosa* není zatím zcela jasné a přesné.

Jiný názor na rozdělení genových poolů zastává Koopman et al. (1998), který řadí druhy sekce *Lactuca* subsekce *Lactuca* do primárního a sekundárního genového poolu a druhy ze sekcí *Phaenixopus*, *Mulgedium* a *Lactucopsis* do terciárního poolu.

Lebeda et al. (2009a) poukazuje na skutečnost, že v současné době kultivary *L. sativa* vykazují omezenou genetickou diverzitu a v důsledku toho chybí efektivní zdroje pro zlepšení jejich vlastností, proto se pozornost vědeckých pracovníků a šlechtitelů stále častěji zaměřuje na výše uvedené plané příbuzné druhy, které mohou přirozeným způsobem (křížením) obohacovat genetickou variabilitu kulturních plodin a zlepšovat tak vlastnosti *L. sativa* (senzorické a chuťové parametry, trvanlivost listů, rezistence vůči patogenům, tolerance k biotickým a abiotickým stresům, aj.) (Lebeda et al., 2014). Z rodu *Lactuca* se především jedná o plané druhy *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*, které se podílely na vyšlechtění nejrůznějších odrůd *L. sativa* (McGuire et al., 1993; Lebeda et al., 2002). Znalost jejich taxonomického zařazení, křížitelnosti a dalších vlastností je významná nejen z botanického hlediska, ale zároveň urychluje a rozšiřuje možnosti jejich úspěšného využití ve šlechtitelské praxi (Lebeda et al., 2004). Pro studium genetické variability planých progenitorů pěstovaného salátu jsou v současnosti nejvíce využívány molekulární markery; především mikrosatelitní markery (Witsenboer et al., 1997; Alexander et al., 2009; van de Wiel et al., 2010) a AFLP markery (Hill et al., 1996; Koopman et al., 2001; Kitner et al., 2008; Lebeda et al., 2009b; van de Wiel et al., 2010).

Do dnešní doby byla největší pozornost věnována studiu druhu *L. serriola*, jeho geografickému rozšíření, ekologii a v neposlední řadě molekulárním studiím (Koopman et al., 2001; Doležalová et al., 2002a; Dziechciarková et al., 2004; Kitner et al., 2008; Lebeda et al., 2004, 2006, 2009b, 2012). *Lactuca serriola* byla využita jako donor rezistence proti virům (Lettuce Mosaic Virus), bakteriím (Corky Root), proti houbovým patogenům jako je padlí čekankové (*Golovinomyces cichoracearum*) a zejména k plísni salátové (*Bremia lactucae*) (Lebeda et al., 2007b, 2014).

Současné studie naznačují, že i právě studovaný druh *L. aculeata* by mohl tvořit zdroj genů pro šlechtění odrůd kulturního salátu, zejména jako významný donor genů rezistence vůči chorobám, škůdcům a dalším faktorům, které dnes ohrožují moderní kultivary salátu (Lebeda et al., 2002, 2007a, 2009a). Blízká příbuznost *L. aculeata* a *L. sativa* byla podpořena výskytem spontánní hybridizace v přírodních podmínkách (Zohary, 1991), analýzou esterázového polymorfismu (Roux et al. 1985), metodou AFLP fingerprintingu (Koopman et al., 2001), ITS-1 DNA sekvence (Koopman et al., 1998). Lebeda et al. (2007a) poukazuje na fakt, že ačkoliv *L. aculeata* představuje primární genový pool pro šlechtění kulturního salátu (*L. sativa*) a je považována za jednoho z potenciálních zdrojů rezistence *L. sativa* k výše jmenovaným faktorům, je v mezinárodních genových bankách stále velmi vzácná, nedostatečně charakterizována a informace o její variabilitě jsou neúplné (Lebeda et al., 2004, 2007a; 2009a). Právě dobrá znalost taxonomického zařazení, morfologie, anatomie a karyologie druhu zvyšuje její potenciální úspěšnost využití při šlechtění. Do dnešní doby bylo publikováno jen několik málo studií, které se zabývají druhem *L. aculeata*.

Současné studie pracují na charakterizaci souboru vzorků *L. aculeata* sesbíraných Dr. Alexem Beharavem (Univerzity of Haifa, Izrael) (sběr proběhl mezi roky 2007-2009) a také prof. Alešem Lebedou (PřF UP Olomouc) (sběr proběhl v roce 2007) v Dan Valley, Hula Plain a v okolí Golanských výšin (Beharav et al., 2008). Pozornost se zaměřuje zejména na ekogeografické rozšíření, charakter stanovišť (Beharav et al., 2010a), na fytochemické studium seskviterpenových laktonů (Beharav et al., 2010b) a také na studium rezistence vůči plísni salátové (*Bremia lactucae*) (Beharav et al., 2014).

Na druh *Lactuca aculeata* se také zaměřuje diplomová práce Vafkové (2012), která se zabývá fenotypovou a fenologickou variabilitou mezi druhy *L. serriola*, *L. saligna* a *L. aculeata*. V této práci bylo hodnoceno celkem 27 fenotypových znaků a 3 fenologické charakteristiky (Doležalová et al., 2002b). Fenotypové znaky byly hodnoceny na rozetovém a lodyžním listu, na stonku, květu a květenství. Z fenologických charakteristik bylo pozorováno a hodnoceno vybíhání, kvetení a tvorba nažek.

3.3 Genetické markery používané při studiu rodu *Lactuca L.*

Ke studiu genetické variability populací se od 60. let 20. století používají genetické markery, jež umožňují určit, které alely jsou v populaci přítomné. Prvními používanými genetickými markery byly *diskrétní (viditelné) polymorfismy*, které ovšem nejsou ovlivněné prostředím, odhalují jen malou část genetické variability a nejsou reprezentativní pro celý genom. Z těchto důvodů došlo v posledních desetiletích k rozvoji technologie molekulárních markerů (Bretting and Widrlechner, 1995), které se používají ke zkoumání taxonomie, fylogeneze, genetické variability a šlechtění rostlin (Simko, 2009). Rozvoj molekulárních markerů zásadním způsobem ovlivnil rychlost a úspěšnost šlechtitelského procesu a získávání nových odrůd pěstovaných rostlin. Prvním typem molekulárních markerů využívaných při studiu variability rodů *Lactuca* spp. byly od poloviny 20. století proteinové markery - *isoenzymy*, tj. polymorfní molekulární formy enzymů se stejnou funkcí v metabolismu katalyzující stejnou chemickou reakci, ovšem s odlišnou primární strukturou. Výhodou isoenzymů je jejich kodominantní charakter (umožňuje odlišit dominantní homozygoty, heterozygoty a recesivní homozygoty). Tato technika byla využita k charakterizaci genových sbírek rodu *Lactuca L.* (Lebeda et al., 1998), k identifikaci hybridů, k určení polyploidie a příbuzenských vztahů mezi planými a kulturními druhy salátu (Roux et al., 1985; Kesseli and Michelmore, 1986; Cole et al., 1991; Dziechciarková et al., 2004; Lebeda et al., 2009b) a také k identifikaci mezidruhových hybridů (Lebeda et al., 2012). Tato studie je do současnosti nejobsáhlejší studií zaměřující se na druh *L. aculeata*. Celkem bylo analyzováno 13 izraelských populací čítající 31 vzorků.

Ačkoliv isoenzymová analýza byla hojně využívanou metodou ještě v prvním desetiletí 21. století, postupně byla nahrazena pokročilejšími a variabilnějšími typy markerů, které hodnotí vlastní strukturu DNA a které eliminují nedostatky isoenzymové analýzy; např. potřebu čerstvého materiálu, práci s vysoce toxickými chemikáliemi a složitou interpretaci získaných výsledků (převážně enzymů s kvartérní strukturou).

3.3.1 DNA markery

Narozdíl od isoenzymů jsou tyto markery více variabilní, nejsou tak významně ovlivněné prostředím (selektivní neutralita) a mohou charakterizovat celý genom (Řepková and Relichová, 2001). Další výhodou DNA technik je fakt, že jsou vysoce informativní, mohou být získány i z velmi malého množství rostlinného materiálu a také v libovolné fázi ontogenetického vývoje organismu (popř. také z herbarizovaných položek).

Pomocí DNA markerů lze detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy, populacemi, klony, jedinci i buňkami. DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány například pro DNA fingerprinting, při zjišťování genetické čistoty osiva, ale i pro testování otcovství, sledování určitých genů při šlechtění, genetické mapování, populační genetiku a při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické a taxonomické analýzy).

3.3.1.1 Metody založené na restrikčním štěpení a hybridizaci

Tyto techniky představují historicky první skupinu molekulárních markerů, které byly používány v počátcích molekulární biologie (tj. od 70. let 20. století), avšak v současné době jsou nahrazovány technikami založenými na polymerázové řetězové reakci (PCR).

3.3.1.1.1 RFLP

Metoda RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms = polymorfismus délky restrikčních fragmentů) je jedna z nejstarších metod DNA markerů, která je založená na restrikčním štěpení a hybridizaci. Při této metodě jsou detekovány změny v sekvencích, jež jsou rozpoznávány restrikčními endonukleasami, které nastříhají DNA na velké množství fragmentů. Nastříhané fragmenty jsou rozděleny pomocí elektroforézy, přeneseny (blotovány) na speciální membránu (tzv. Southernův přenos) (Southern, 1975), kde je vizualizována pouze část fragmentů použitím specifické sondy (např. oligonukleotidové sekvence značené radioaktivní i neradioaktivní značkou).

RFLP markery byly u rostlin poprvé využity pro tvorbu genetických map, pro určování otcovství. Výhodou je její kodominantní charakter, který umožňuje rozlišit homozygoty (1 fragment) od heterozygotů (2 fragmenty). Nevýhodou této metody je její celková pracnost, časová a finanční náročnost a vysoká výchozí koncentrace DNA pro restrikční štěpení, proto se dnes využívá RFLP ve spojení s PCR (PCR-RFLP), kdy je zapotřebí nižší koncentrace výchozí DNA (při PCR dochází k její amplifikaci).

RFLP metoda byla použita při studiu rodu *Lactuca* L. ke konstrukci genetické mapy *L. sativa* (Landry et al., 1987), ke stanovení proměnlivosti druhu (Kesselli et al., 1991, 1994; Vermeulen et al., 1994; Yang et al., 2007; Truco et al., 2007). Pomocí RFLP metody bylo také prokázáno, že *L. sativa* je blízce příbuzná k *L. serriola*, ale není blízce příbuzná k *L. saligna*, *L. virosa*, *L. perennis* a *L. indica*.

3.3.1.2 Metody založené na PCR amplifikaci

Rozdíly mezi metodami spadajícími do této kategorie, spočívají v různých délkách a sekvencích použitých primerů, v přísnosti PCR podmínek a metody separace a detekce fragmentů (Karp and Edwards, 1997).

3.3.1.2.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, **P**olymerase **C**hain **R**eaction) (Mullis, 1987) je metoda *in vitro* amplifikace (namnožení) specifického fragmentu DNA o známé sekvenci bazí. Princip amplifikace DNA touto *in vitro* metodou je podobný replikaci DNA *in vivo*, podmínkou je znalost sekvence nukleotidů v bezprostředním sousedství úseku DNA, který má být amplifikován (ovšem vlastní sekvence tohoto úseku nemusí být známá). K denuraci dvouřetězcové DNA dojde vysokou teplotou a vznikne jednořetězcové vlákno DNA, které slouží jako templát. V další fázi je zapotřebí dvou primerů (chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů), které se připojí ke komplementárním úsekům řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. Pomocí primerů je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Kopie úseku DNA jsou syntetizovány podle templátu pomocí enzymu DNA-polymerázy na principu komplementarity bazí.

PCR reakce se skládá ze tří po sobě jdoucích kroků - *denaturace*, *annealing* a *extenze*, které se cyklicky se opakují se a liší se teplotními podmínkami. Každý krok trvá obvykle 1-2 minuty. Šmarda et al. (2005) uvádí, že k dostatečné amplifikaci je zapotřebí okolo 30 až 40-ti cyklů, přičemž množství nasyntetizovaných sekvencí přibývá exponenciální řadou. PCR reakce se provádí v termocykleru, který je schopný periodicky a relativně rychle měnit teplotu podle nastaveného programu. Výhodou PCR je, že vyžaduje minimální množství DNA (teoreticky stačí 1 molekula DNA). Touto metodou lze získat 2^n kopií DNA, kdy n je počet cyklů. Z jedné molekuly DNA lze tedy například získat po proběhnutí 30-ti amplifikačních cyklů víc než 10^9 kopií.

Reakční směs pro PCR se skládá z následujících složek:

1. *templátová DNA* (matrice) obsahuje úsek DNA, který se má amplifikovat
2. *“forward” a “reverse” primery*, což jsou krátké oligonukleotidové řetězce DNA
3. *prekurzory DNA* – 4 deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) sloužící k syntéze nového polynukleotidového řetězce

4. *DNA polymeráza* - enzym katalyzující polymeraci DNA. Podle zvolené DNA polymerázy se do směsi přidává pufr, který zajišťuje správné fungování reakce, deionizovaná voda (s vodivostí do $0,2 \mu\text{S}\cdot\text{ml}^{-1}$), popř. hořečnaté ionty ve formě MgCl_2 , které jsou nezbytné pro správnou činnost DNA polymerázy

3.3.1.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity (SSR - simple sequence repeats; Tautz, 1989) nebo (STRs - short tandem repeats; Edwards et al., 1991) jsou krátké tandemově se opakující sekvenční motivy DNA, vyskytující se ve všech eukaryotických genomech. Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu (Weising et al., 2005). Obvykle se však tato polymorfnní místa vyskytují v nekódujících oblastech DNA (telomery, subtelomery, heterochromatin u centromer) (Tautz and Renz, 1984). Délka základního motivu se nejčastěji uvádí od 1 do 6 nukleotidů, i když někteří autoři jednonukleotidová opakování do mikrosatelitů nezahrnují (Chambers and MacAvoy, 2000).

Příklad dvou různých alel:

Alela A: **ATAT** (2 opakování AT sekvence)

Alela B: **ATATATATATAT** (6 opakování AT sekvence)

Mikrosatelity můžeme kromě délky základní jednotky repetice (viz. výše) dělit také podle jejich struktury do tří základních kategorií, které mohou být dále kombinovány (Weising et al., 2005):

1. *Dokonalé mikrosatelity* jsou tvořené jedním stále se opakujícím motivem; např. $(\text{TA})_n$.
2. *Nedokonalé mikrosatelity* jsou ty, kde je hlavní motiv přerušen; např. $(\text{TA})_n\text{C}(\text{TA})_n$.
3. *Složené mikrosatelity* jsou tvořeny dvěma typy repetice, které k sobě těsně přiléhají; např. $(\text{TA})_n(\text{GT})_n$.

Díky vysoké mutační rychlosti jsou mikrosatelity v počtu opakování dané sekvence velmi polymorfnní (Tautz, 1989). Ke změnám v počtu opakování repetice dochází v daném lokusu průměrně 1x za 1000 generací, což je o několik řádů častěji, než vznikají např. jednonukleotidové mutace v jiných částech genomu (v kódujících oblastech). Počet repetice daného motivu je dán mnoha faktory,

kdy vlastní příčinou je chromosomální dynamika: chromosomální aberace, nerovnoměrný crossing-over, amplifikace a neúplná replikace určitých segmentů chromosomální DNA (Ondřej, 1992).

Vysoká mutační rychlost se nejčastěji klade do souvislosti se sklouznutím (replication slippage) polymerázy během replikace DNA, kdy dochází k prodlužování nebo zkracování počtu kopií (Streisinger et al., 1966). Obecně platí, že čím větší počet repetice daný lokus má, tím snadněji dojde ke sklouznutí (tzn. že delší lokusy budou více polymorfni).

Využití mikrosatelitů je velmi široké. Jednotlivé lokusy jsou velmi variabilní co do počtu opakování základní jednotky, což společně s jejich výskytem po celém genomu všech eukaryotických buněk, z nich činí oblíbené molekulární markery s širokým spektrem využití. Své uplatnění našly při studiu vnitrodruhové variability, určování paternity, nebo při studiu parametrů populačně-genetické struktury (tok genů a jeho bariéry, efektivní velikost populace nebo odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy). Výhodou je také vysoká reprodukovatelnost, kodominance, velké množství alel v lokusu a Mendelovská dědičnost těchto znaků.

Nevýhodou a úskalím mikrosatelitů je skutečnost, že se musí pro každý druh nalézt a identifikovat sada primerů vhodných k jejich amplifikaci. Je popsáno několik základních způsobů vývoje mikrosatelitních markerů.

Prvním klasickým způsobem vývoje mikrosatelitních markerů je izolace *de novo* z DNA daného druhu. Nejprve je izolovaná genomická DNA rozštěpána pomocí restričních endonukleáz a vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí elektroforézy. Fragmenty o velikosti 300 - 700 bp jsou vloženy do plazmidového vektoru (přímo nebo pomocí adaptorů), kterým se transformují kompetentní bakteriální buňky a vznikají tak tisíce rekombinantních klonů. Klony obsahující mikrosatelitové repetice se vyselektují, namnoží a osekvenují. Proveďte se konstrukce primerů, které jsou specifické pro daný mikrosatelitový lokus (Zane et al., 2002). Následuje ověření funkčnosti těchto primerů (optimalizace PCR), a selekce polymorfních markerů, které jsou schopny detekovat určitou variabilitu mezi jedinci.

Je zřejmé, že tradiční techniky vývoje SSR markerů jsou finančně náročné, zdlouhavé a neefektivní (Ellis and Burke, 2007). Proto se častěji přistupuje ke *cross-species PCR amplifikaci* (Primmer et al., 1999), kdy se využívají mikrosatelitové markery již dříve navržené pro velmi blízce příbuzný druh, přičemž s fylogenetickou vzdáleností se úspěšnost amplifikace snižuje. U mikrosatelitů, které jsou polymorfni, pak dochází k optimalizaci PCR podmínek a doby elektroforetické separace.

Další možností je *vývoj EST-SSR markerů* využitím veřejně dostupných databází obsahující tzv. EST (Expressed Sequence Tags = místa s expresní adresou) sekvence, které jsou získané

sekvenací produktů reverzní transkripce z mRNA (cDNA). EST databáze je spravována NCBI (National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace) a obsahuje stále více cDNA sekvencí, ze kterých lze pomocí speciálního softwaru navrhovat nové EST-SSR markery (Simko, 2009; Riar et al., 2011). Výhodou EST-SSR je, že jsou lépe přenositelné mezi blízkými příbuznými druhy než klasické anonymní SSR z nepřekládaných oblastí nebo nekódujících sekvencí (Riar et al., 2011).

U rodu *Lactuca* bylo do roku 2008 publikováno jen několik málo prací využívající mikrosatelity (Witsenboer et al., 1997; Sicard et al., 1999, van de Wiel, 1998, 1999; Lu et al., 2007; Alexander et al., 2009), a to především z důvodu nedostupnosti primerových sekvencí pro širší vědeckou veřejnost. Tyto sekvence byly chráněny a byly známy pouze u dvou mikrosatelitních markerů, a to MSAT15-34 a MSATE6 (Okubara et al., 1997).

Díky rozsáhlému projektu pod záštitou *Compositae Genome Projekt* (CGP, www.compgenomics.ucdavis.edu) bylo publikováno přibližně 200 000 EST sekvencí, které byly získány z 5 druhů *Lactuca* spp. (*L. serriola*, *L. sativa*, *L. perrenis*, *L. virosa* a *L. saligna*). Právě díky zveřejnění této EST databáze došlo k navržení relativně velkého počtu EST-SSR markerů (Simko, 2009; Riar et al., 2011).

Simko et al. (2009) publikoval sadu 61 EST-SSR markerů vyvinutých “*in silico*” pro rod *L. sativa* a *L. serriola*. Úspěšně amplifikované markery označil jako SML neboli *Salinas Microsatellite for Lettuce*. Tyto markery byly testované a optimalizované na druhy *L. sativa*, *L. serriola*, *L. saligna* a *L. virosa*.

Další studií využívající EST-SSR u rodu *Lactuca* L. je práce Riar et al. (2011), která se zabývala designem EST-SSR markerů pro druh *L. serriola* a jejich využitelnost pro studie genetické variability u druhů *L. sativa* a *L. perrenis*. Dále se zabývali identifikací markerů spojených s rezistencí vůči herbicidům 2,4-D a ALS u druhu *L. serriola*. Tato práce potvrdila převoditelnost EST-SSR markerů a prokázala jejich využitelnost při studiu genetické variability v rámci rodu *Lactuca*. Zároveň byly detekovány dva markery spjaté s rezistencí *L. serriola* k herbicidům – marker *WSULs-75_2* pro rezistenci k 2,4-D a *WSULs-163* pro rezistenci k ALS. Z výsledků srovnávacích studií (Russel et al., 1997; Nagaoka and Ogihara, 1997) se mikrosatelity zdají být nejvhodnější metodou pro populačně-genetické studie v rámci druhu a díky svému vysokému polymorfismu jsou jedním z nejpoužívanějších genetických markerů vůbec. V současnosti představují mikrosatelitní markery (společně s AFLP markery) účinný nástroj při správě a studiu genových zdrojů rodu *Lactuca* (Spooner et al., 2005).

Problémy při vyhodnocování mikrosatelitů (PCR produktů)

Vyhodnocování produktů PCR reakce nejčastěji komplikuje přítomnost nulových alel, shadow (stutter) bandů a také homoplazie alel.

Nulová alela

Jako nulová alela se označuje každá alela mikrosatelitového lokusu, kterou nelze pomocí polymerázové řetězové reakce amplifikovat na detekovatelnou úroveň (Dakin and Avise, 2004). Jednou z možností vzniku může být mutace v oblasti DNA, která je homologní k sekvenci primeru (obvykle v úseku blízkém 3' konci primeru), a tím je znemožněno proběhnutí PCR reakce (nasednutí primeru). Další možnou příčinou je podle Chapuise and Estoupa (2007) preferenční amplifikace kratších alel nebo sklouznutí polymerázy během PCR amplifikace. Při genovém mapování nevede přítomnost nulové alely ke znehodnocení získaných dat, ale může vést ke ztrátě informací.

Shadow (stutter) bandy

Při analýze PCR produktů se můžeme setkat také s tzv. shadow (stutter, stínovými) bandy, které vznikají během amplifikace DNA sklouznutím polymerázy při replikaci (replication slippage) komplementárního řetězce. Takto vznikají o něco kratší fragmenty DNA (obvykle jsou zkrácené o dvě nebo čtyři opakující se jednotky). Nejčastěji se shadow bandy vyskytují u dinukleotidových repetíci, méně často u trinukleotidových a tetranukleotidových (Daniels et al., 1998). Na získaném elektroforetogramu je pak pozorujeme jako světlejší proužky nacházející se pod hlavní alelou. Walsh et al. (1996) uvádí, že problém při hodnocení výsledků nastává tehdy, když se shadow band jedné alely překrývá s hlavním produktem jiné alely.

Homoplazie alel

Tento termín označuje alely stejné délky pocházející z jiných lokusů genomu (nejsou odvozeny od jedné ancestrální alely), které při elektroforéze komigrují a při vizualizaci se jeví jako identické (Paris et al., 2010). Fragmenty se stejnou elektroforetickou mobilitou mohou být částmi kopií genů, pseudogenů, transpozomů a především repetitivních částí genomu. Negativnímu ovlivnění výsledků detekcí homoplazických fragmentů lze snadno předejít redukcí počtu fragmentů při jedné selektivní amplifikaci. Je-li testováno dostačující množství mikrosatelitových lokusů, nezpůsobuje alelová homoplazie velké problémy, neboť je kompenzována vysokou variabilitou mikrosatelitových lokusů (Estoup et al., 2002).

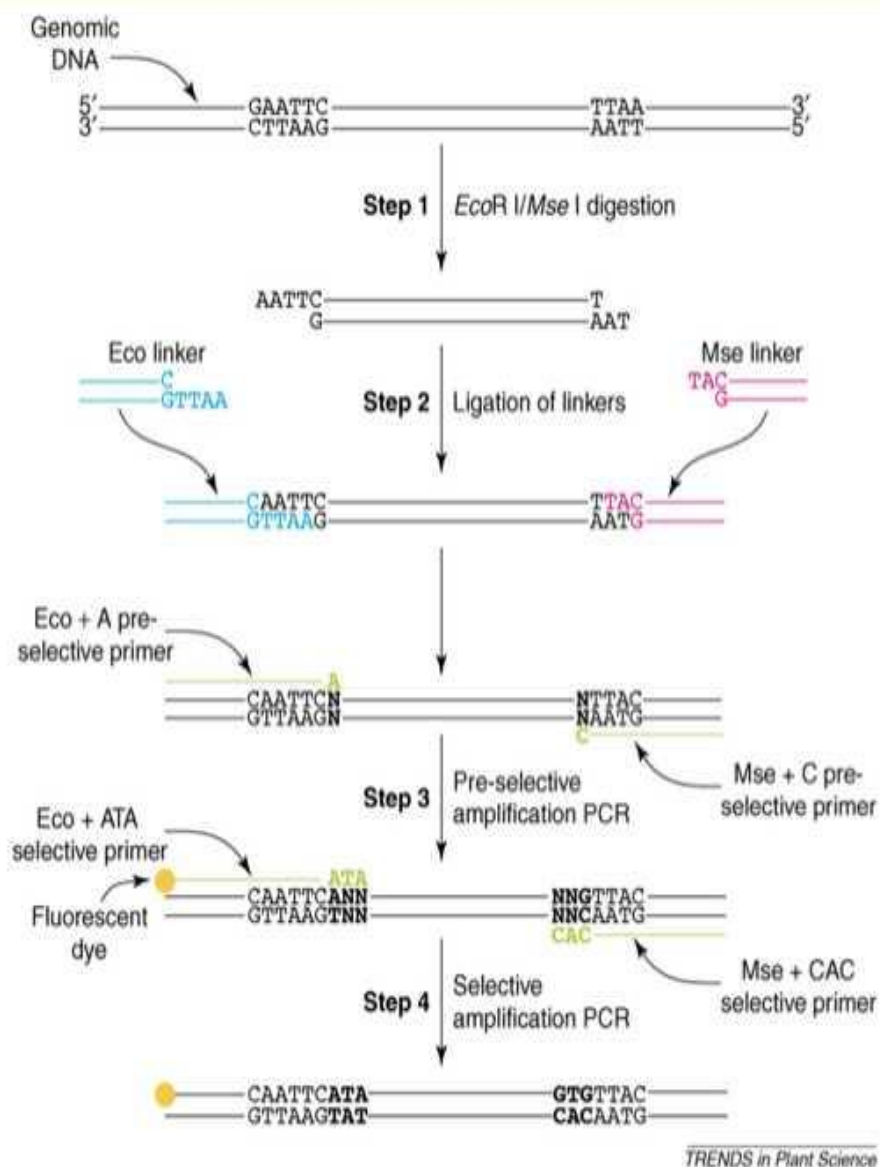
3.3.1.2.3 AFLP

Metoda AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**enght **P**olymorphisms = délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů) kombinuje postupy jak RFLP tak PCR a detekuje polymorfismus na úrovni DNA. Uskutečňuje se v několika krocích a je založena na selektivní polymerázové řetězové reakci (PCR), při které dochází k amplifikaci (namnožení) subpopulace fragmentů DNA. U AFLP není potřeba předcházející znalosti konkrétní DNA sekvence u studovaného druhu (Vos et al., 1995; Schlötterer, 2004).

Obecně lze AFLP techniku popsat v následujících 5 základních krocích:

1. V prvním kroku, tzv. **restrikci** se rozštěpí genomická DNA dvěma restrikázami *EcoRI* (šestibázový palindrom) a *MseI* (čtyřbázový palindrom), přičemž vznikají tři typy DNA fragmentů (*Eco-Eco*, *Eco-Mse*, *Mse-Mse*) s tzv. lepivými konci (sticky ends) (Meudt and Clarke, 2007). Výsledkem tohoto kroku jsou tedy různé dlouhé fragmenty DNA anonymní povahy pocházející z různých částí genomu, které mají na svých koncích jednovláknové přesahy (zbytky restrikčních míst) o velikosti několika bází.
2. Druhým krokem je **ligace**, kdy pomocí enzymu DNA-ligázy dochází k připojení synteticky připravených krátkých dvouřetězcových úseků DNA o známé sekvenci (tzv. adaptory) ke zbytku restrikčních míst fragmentů DNA vzniklých v předchozí reakci. Díky tomuto kroku se mění původní anonymní povaha restrikčních fragmentů a díky znalosti sekvence adaptorů můžeme v následujících krocích provádět PCR reakce, v nichž používáme primery komplementární právě k sekvenci adaptoru. Spojení adaptorů a konců restrikčních fragmentů zajišťuje enzym T₄ DNA ligasa.
3. Třetím krokem je **preselektivní amplifikace** (preamplifikace), ve které dochází k pomnožení (amplifikaci) fragmentů DNA s navázanými adaptory pomocí klasické PCR reakce s dvojicí primerů, které jsou komplementární k sekvenci adaptorů. Každý z těchto primerů navíc obsahuje na 3'konci nukleotid zasahující dovnitř amplifikovaných fragmentů DNA. Díky prodloužení o jednu selektivní bázi se amplifikuje pouze 1/16 restrikčních fragmentů z celkového počtu fragmentů vzniklých v prvním kroku. Zároveň se ve výsledné reakční směsi zvýší podíl "*MseI* - *EcoRI*" fragmentů oproti fragmentům "*MseI* - *MseI*" a "*EcoRI* - *EcoRI*". Výše uvedené kroky (restrikce – ligace – preselektivní amplifikace) se provádějí pouze jedenkrát. Výsledek preamplifikační reakce se naředí a slouží jako matrice pro selektivní amplifikaci.

4. Tento čtvrtý krok (**selektivní amplifikace**) se provádí opakovaně s použitím různých primerů prodloužených o další selektivní nukleotidy (zpravidla o dva a více). Počet a typ nukleotidů se provádí experimentálně tak, aby po elektroforetické separaci a vizualizaci PCR fragmentů byl získán informativní a spolehlivě hodnotitelný záznam.
5. V posledním kroku se amplifikované fragmenty separují pomocí vertikální elektroforézy a následně detekují barvením stříbrem, popřípadě při použití fluorescenčně značených primerů se provádí separace a detekce na automatickém sekvenátoru.



Obrázek 2. Grafické znázornění jednotlivých kroků AFLP techniky (Meudt and Clark, 2007).

Aplikace této metody je velice rozmanitá, představuje účinný nástroj pro hodnocení genetické variability genových sbírek, s její pomocí lze získat velké množství markerů, které je možné využít i například při studiu molekulární ekologie a evoluce populací. Tato metoda může také být užitečným nástrojem pro získání fylogenetických dat mezi blízkými taxony (Koopman, 2005).

Mezi hlavní výhody této metody patří její velmi dobrá reprodukovatelnost, možnost aplikace na prakticky jakýkoliv rostlinný nebo živočišný druh bez předchozí znalosti sekvence cílové DNA, relativně vysoká míra detekované variability ve srovnání např. s mikrosatelity, RFLP, sekvenováním. Získané markery mohou být dále izolovány, klonovány, sekvenovány a převedeny na jiný typ molekulárních markerů.

Nevýhodou AFLP metody je potřeba kvalitní nefragmentované DNA, anonymní povaha fragmentů a dominantní charakter, kdy nemůžeme rozlišit homozygoty (AA) od heterozygotů (Aa), jelikož je band přítomný v obou těchto případech (Meudt and Clark, 2007). Další nevýhodou AFLP metody je možnost homoplazie alel (viz. str. 22).

V rámci rodu *Lactuca* L. byla AFLP metoda použita k determinaci fylogenetické příbuznosti u rodu *Lactuca* L. (Hill et al., 1996), pro zhotovení vazebných map (Truco et al., 2007), pro detekci a mapování genů rezistence proti *Bremia lactucae* (Jeuken et al., 2008), pro analýzu genetické variability u planých druhů salátů (Ayad et al., 1997; Spooner et al., 2005; Kitner et al., 2008), ke studiu genetické struktury a diverzity přirozených populací *L. serriola* (Kuang et al., 2008), k posouzení genetické variability *L. serriola* pocházejících z různých částí Evropy (Lebeda et al., 2009b) a také ve spojení s ITS1 sekvenováním ke studiu příbuznosti mezi druhy *Lactuca* spp. a jejich příbuzných druhů (Koopman et al., 1998; 2001).

V současnosti jsou publikovány studie spojující metodu AFLP se SSR, které se zaměřují na genetickou variabilitu přírodních populací (van Treuren a van Hintum, 2009; van de Wiel et al., 2010, Hooftman et al., 2011). Jemelková et al. (2013) pomocí obou metod charakterizovala pracovní kolekci genových zdrojů *L. aculeata* a získaná data byla použita ke studiu rezistence *L. aculeata* k *Bremia lactucae*. V loňském roce byla publikována práce Kitner et al. (2014), která se zabývá studiem genetické variability přirozených populace tří planě rostoucích locik (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. aculeata*; dvě populace pro každý druh) pocházejících z Izraele. V této práci bylo použito 11 EST-SSR a 230 AFLP markerů.

3.3.1.2.4 RAPD

Tuto jednoduchou a rychlou metodu RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA = polymorfismus náhodně amplifikovaná DNA) jako jeden z prvních použil Williams et al. (1990). Princip je založen na amplifikaci fragmentů DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru (obvykle s délkou 10 bazí), které jsou díky své krátké délce motivu a výrazně nižší teplotě annealingu (35-38 °C) nespecifické (nasedají na mnoha místech molekuly DNA). K této metodě není zapotřebí předchozí znalosti zkoumaného taxonu a k analýze postačí jen malé množství DNA (25 ng). Nevýhodou RAPD je nízká reproducibilita, tj. problém v porovnání výsledků mezi různými studii (Jones et al., 1997). Dalším úskalím této metody je komigrace dvou fragmentů, které nelze automaticky považovat za homology (může se jednat o dva stejně velké fragmenty, ale pocházející z různých částí genomu). Ačkoliv tyto nevýhody nijak neomezuují použití RAPD markerů pro studie genetické variability populací (Weising et al., 2005), jsou v současnosti nahrazovány mikrosatelitními a AFLP markery.

Waycott and Fort (1994) použili RAPD k hodnocení rozdílů mezi položkami salátů a pro stanovení odlišností mezi liniemi, které se zdají být blízké příbuzné populacím v kolekcích genových zdrojů. Metoda RAPD byla u rodu *Lactuca* L. použita také v následujících studiích (Truco et al., 2007; Yang et al., 2007; D'Andrea et al., 2008).

3.3.1.2.5 TRAP

Tato metoda TRAP (**T**arget **R**egion **A**mplified **P**olymorphism) je výhodná pro své poměrně jednoduché laboratorní provedení při vysokém stupni polymorfismu detekovaném při jedné analýze (zahrnuje výhody RAPD i AFLP). Při TRAP analýze se využívají dva druhy primerů s délkou 18ti nukleotidů. Prvním z nich jsou tzv. *fixní primery*, které jsou cíleně navrhovány podle známých sekvencí kódujících určité dostupné geny (z EST databáze). Druhým druhem je *náhodný primer* obsahující variabilní koncovou část se selektivními nukleotidy (3-4) na 3' konci primeru, dále střední sekvence s opakujícími se motivy AG- nebo GC-, díky nimž primer nasedá na introny nebo exony v oblasti genu určeného fixním primerem a koncová sekvence navrhovaná podle obecných zásad designu primerů (Hu and Vick, 2003).

Metodu TRAP použil Hu et al. (2005) ve své studii planých druhů a kultivarů *L. sativa*. V pozdějších letech nebyla zatím metoda TRAP použita.

Jak je výše uvedeno, během první dekády 21. století došlo k velkému posunu v metodice v oblasti molekulárních markerů. Dříve hojně využívaná isoenzymová analýza se dostala do ústraní a do popředí se dostaly pokročilejší DNA metody (převážně AFLP a SSR). V současné době dochází k rozvoji dalších technologií. Jedním z moderních přístupů genomiky jsou *genové čipy*, které umožňují sledovat variabilitu tisíců genů zároveň (McHale et al., 2009; van Leeuwen et al., 2009; Argyris et al., 2011; Uwimana et al., 2012) nebo také metoda *sekvenování genomu*.

3.3.1.2.6 Sekvenování

Tato metoda přesně určí pořadí nukleotidů ve studovaném úseku DNA a poskytne detailní informace o nejzákladnější struktuře genetického materiálu. Výhodou je, že množství zkoumaných znaků je relativně vysoké oproti předchozím metodám (zpravidla se v jednom kroku analyzuje oblast o délce 700 - 900 párů bazí). Díky archivaci sekvenačních dat v internetových databázích (např. GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) je reproducibilita této metody poměrně vysoká a dovoluje srovnávat výsledky různých studií, jedince z různých geografických oblastí či provádět fylogenetické analýzy, aj.

V současnosti lze podle délky sekvenovaného úseku rozdělit sekvenační metody do dvou skupin. První skupinou je *sekvenace krátkých úseků DNA* (cca do délky 700 – 900bp) využívající modifikovanou Sangerovu metodu sekvenování (Sanger et al., 1977), která je založená na terminaci syntézy nově vznikajícího řetězce DNA použitím fluorescenčně značených dideoxyribonukleotidů. Sekvenace kratších úseků DNA se obecně používá při studiu fylogeneze, rychlosti evoluce, vzniku a původu druhů, při studiu mezidruhové hybridizace, ale také při vývoji molekulárních markerů a při studiu genů rezistence (Awise, 2004; Weising et al., 2005).

Druhou skupinou sekvenačních metod je *celogenomové sekvenování*, tzv. sekvenování nové generace (NGS, next-generation sequencing). Narozdíl od výše uvedené Sangerovy metody získáme z jedné sekvenční reakce informace o nukleotidovém složení rozsáhlých částí DNA nebo dokonce o sekvenci celého genomu. Metodou celogenomového sekvenování získáme informace o milionech krátkých sekvencí o délce 30 - 300bp, které jsou následně analyzovány (sekvence se stejným nukleotidovým motivem jsou kladeny nad sebe a tím dochází k postupnému prodlužování délky výsledné sekvence).

Jelikož je celogenomové sekvenování finančně nákladné, vědecké týmy se snaží o cílené obohacování přesně definovaných úseků genomické DNA (tzn. že se délka sekvenované oblasti

genomu redukuje jen na studovanou oblast). Díky tomu dochází ke snížení nákladů na samotnou sekvenaci a také usnadňuje následné bioinformatické zpracování. V rámci rodu *Lactuca* se tyto přístupy aplikují především u kulturního salátu, avšak kompletní genom *L. sativa* nebyl doposud publikován (Lebeda et al., 2014). Prozatím je znám pouze genom chloroplastu *L. sativa* (Timme et al., 2007), který byl ovšem získán “klasicky” Sangerovým sekvenováním, bez použití NGS technologie.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie

AFLP[®] DNA ladder (Invitrogen)

Agaróza (Serva)

Akrylamid (Merck)

Akrylamid-Bis Electran[®] (NN'-Methylenebisacrylamide) směs 19:1 (Merck)

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosidtrifosfáty (Promega)

Dusičnan stříbrný (Lachner)

EcoRI (20,000 U/ml. New England Biolabs)

Etanol 96% roztok (Sigma – Aldrich)

Ethidium bromid (Sigma)

Ethylendiamintetraacetát disodný (Sigma)

Formaldehyd (Lachner)

GoTaq polymeráza (5 U/μl) (Promega)

InnuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena)

Kyselina dusičná (Merck)

Kyselina octová 0,5% (Lachner)

MseI (10,000 U/ml. New England Biolabs)

N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (Merck)

Peroxodisíran amonný (Merck)

Rain-X Repellent, Clear Vue (Turtle Wax)

Silan, 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Sigma)

Uhličitan sodný (Lachner)

Xylenová modř (Applichem)

4.2 Použité přístroje a laboratorní vybavení

Digestoř (Merci)

Elektroforéza T - REX Thermo OWL S3S (Thermo, USA)

Digitální kamera Kodak Edas 290 (Kodak, USA)

Elektroforetická komůrka Hoeffer HF33 (Hoefler, USA)

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

Flowbox PV - 100 (Telstar)

Chladnička (Liebherr)

Mikropipeta 0,5 – 10 μ l (Eppendorf)

Mikropipeta 0,1 – 2,5 μ l (Eppendorf)

Mikropipeta 1 – 10 μ l (Finnpipette)

Mikropipeta 10 – 100 μ l (Eppendorf)

Mikropipeta 100 – 1000 μ l (Eppendorf)

Mikrovlňná trouba ETA 3203, ETA, CZ

Minicentrifuga MCF 2360 (LMS)

Mrazicí pult Premium Nofrost (Liebherr)

Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Negatoskop ELLA NHQ1R (Legros)

Osmikanálová pipeta (1 - 10 μ l) (Eppendorf)

Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA)

Sušárna HS62A (Chirana)

Termocycler TC-XP (Bioer)

Termocycler PTC 200 (MJ Research, Delaware, USA).

Třepačka GFL 3017 (Merci)

Váhy PM 2000 (Mettler)

Vortex – Minishaker, MS2 (IKA, Germany)

Výrobník deionizované vody Aqual 29 XL (Aqual, ČR)

Výrobník ledu Icematic F 100 Compact (Castel Mac)

4.3 Použité roztoky

Denaturační pufr s obsahem formamidu

0,125 g bromfenolové modře

0,125 g xylenové modře

25 ml destilované vody

100 ml formamidu

0,1% roztok dusičnanu stříbrného

2 g AgNO₃ doplnit deionizovanou vodou do 2000 ml

Před použitím přidat 3ml formaldehydu

Fix/stop roztok

165 ml 98% kyseliny octové doplnit deionizovanou vodou do 1500 ml

1% roztok kyseliny dusičné

22,5 ml 65% HNO₃ doplnit deionizovanou vodou do 1500 ml

10% peroxodisíran amonný

1 g peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈ rozpustit v 10 ml deionizované H₂O

Rozpipetuje se do mikrozkušavek po 400 µl a uchovává při teplotě -20 °C

6% polyakrylamidový gel

70 ml zásobního roztoku akrylamidu

467 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného ((NH₄)₂S₂O₈)

46,7 µl N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu (TEMED)

Zásobní roztok 10x TBE pufu

108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)

55 g kyseliny borité (H₃BO₃)

Rozpustit v 900 ml deionizované vody

Poté přidat 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 M (pH 8,0)

Doplnit deionizovanou vodou do 1 l

Vývojka

45 g uhličitanu sodného (Na_2CO_3)

Objem doplnit deionizovanou H_2O do 1500 ml

Vychladit v lednici ($4\text{ }^\circ\text{C}$)

Krátce před použitím přidat 2,25 ml formaldehydu a 300 μl 1% roztoku thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

4.4 Rostlinný materiál

4.4.1 Původ rostlinného materiálu

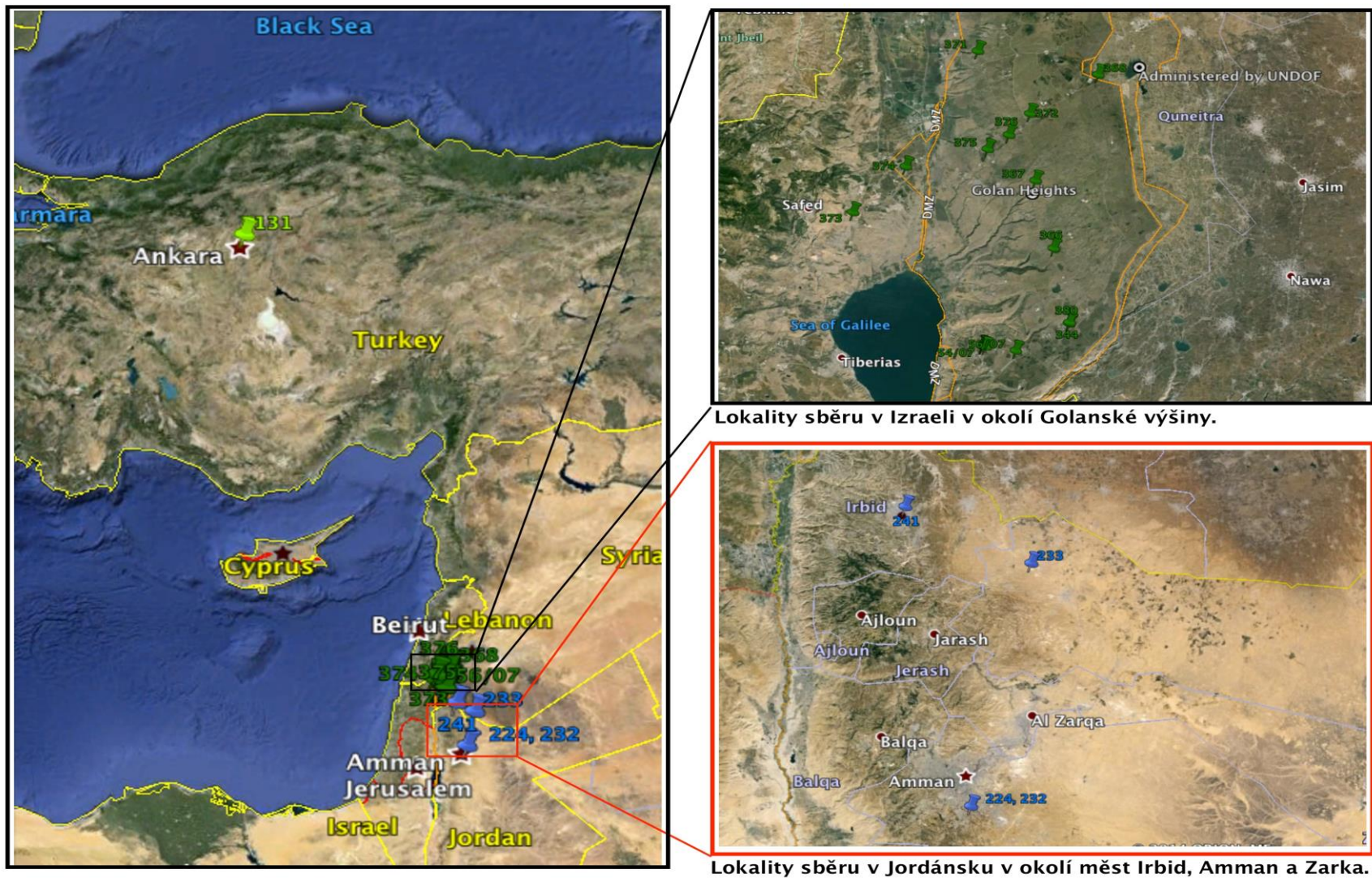
Hodnocený soubor obsahoval 72 vzorků *L. aculeata* pocházejících z 19 přirozených populací z Turecka (1 populace), Jordánska (4 populace) a Izraele (14 populací) a také 3 vzorky *L. serriola* pocházejících z Jordánska (Tabulka 1 a Obrázek 3). Tyto položky jsou uchovávány v Pracovní kolekci rodu *Lactuca* L. Katedry botaniky PřF UP a byly sesbírány Dr. Alexem Beharavem (Univerzity of Haifa, Izrael) a prof. Alešem Lebedou (PřF UP Olomouc) v letech 2007 – 2009 v oblastech Dan Valley, Hula Plain a také v okolí Golanské výšiny (Beharav et al., 2010a). Pro vyloučení duplicitních položek a zachycení rozmanitosti populace byly nažky sesbírány z jednotlivých rostlin vzdálených od sebe minimálně 2 metry (Lebeda et al., 2004).

Geografické pozice jednotlivých lokalit jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1). U některých vzorků pocházejících z Jordánska (populace 224, 232 a 233) nejsou uvedeny geografické koordináty, jelikož tyto vzorky byly sesbírány jordánskými sběrateli a poskytnutá data jsou neúplná (Beharav et al., 2010b).

Tabulka 1. Pasportní data 75 vzorků planých druhů *Lactuca* L., které byly použity pro AFLP a SSR analýzy.

Druh	Označení populace	Označení položky	Stát původu	Lokalita	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Nadmořská výška	
<i>L. aculeata</i>	131	10, 11, 13, 15, 24	TURECKO	Ankara	39°55'14.75"S	32°51'14.81"V	-	
	224	22	JORDÁNSKO	10km jižně od Ammanu	-	-	-	
	232	12, 22, 23	JORDÁNSKO	10km jižně od Ammanu	-	-	-	
	233	1, 16, 17, 19, 20, 20A, 20S, 24, 25, 26, 28, 29	JORDÁNSKO	Mafraq Junction, 35km severně od Zarky	-	-	-	
	241	20	JORDÁNSKO	Haraj, 3km W od Irbidu	32°32'41.45"S	35°51'25.17"V	-	
	343	1, 3, 5, 7	IZRAEL	Giv'at Yo'av	32°48'04.00"S	35°41'22.00"V	340	
	344	1, 4, 5, 6, 8	IZRAEL	Nov, Haspin	32°49'40.00"S	35°47'19.00"V	407	
	366	1, 9	IZRAEL	Gamla	32°54'40.00"S	35°46'15.00"V	469	
	367	1, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 17	IZRAEL	Zomet Hamappalin	32°59'14.00"S	35°45'01.00"V	524	
	368	1, 12	IZRAEL	'En Ziwan	33° 06'21.00"S	35°49'17.00"V	968	
	371	1, 13	IZRAEL	Kela' Alone	33° 07'58.00"S	35°41'04.00"V	644	
	372	14	IZRAEL	Zomet Hashiryon	33° 03'44.00"S	35°44'39.00"V	715	
	373	1, 22	IZRAEL	Elifelet	32° 57'05.00"S	35°32'32.00"V	357	
	374	1, 16	IZRAEL	Mishmar-Hayarden	33° 00'11.00"S	35°36'10.00"V	222	
	375	1, 10	IZRAEL	Qidmat-Zevi-1	33° 01'21.00"S	35°41'46.00"V	432	
	376	1, 15	IZRAEL	Qidmat-Zevi-2	33° 02'18.00"S	35°43'13.00"V	581	
	380	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14	IZRAEL	Nov	32° 49'35.00"S	35°47'16.70"V	-	
		56/07	IZRAEL	Eli Ad	32° 47'45.00"S	35°43'39.00"V	375	
	<i>L. serriola</i>	224	5, 5A, 5B	JORDÁNSKO	10km jižně od Ammanu	-	-	-
	<i>L. aculeata</i> × <i>L. serriola</i>		54/07	IZRAEL	Giv'at Yo'av	32° 48'00.00"S	35°41'33.00"V	341
	343	8A, 8B	IZRAEL	Giv'at Yo'av	32°48'04.00"S	35°41'22.00"V	333	

Obrázek 3. Geografické rozšíření analyzovaných populací planých druhů *L. aculeata*. Geografické koordináty jednotlivých populací jsou uvedeny v Tabulce 1.



4.4.2 Kultivace rostlinného materiálu

Použité rostliny byly kultivovány za standardních podmínek ve skleníku Katedry botaniky PřF UP v Olomouci. Nažky všech vzorků byly vysety do plastových kelímků se sterilním substrátem – perlitem. Klíčení a vzcházení probíhalo v sadbovém skleníku při denní teplotě 16 – 20 °C a noční teplotě 8 – 12 °C. Po 2 - 3 týdnech po vysazení byl proveden odběr vzorků pro extrakci genomické DNA, kdy bylo odebráno asi 0,5 g listů z několika semenáčků představující jednu genofondovou položku (Obrázek 4).

Obrázek 4. Semenáčky *L. aculeata* připravené ke genomické izolaci DNA (2 - 3 týdny po vysazení).



4.4.3 Izolace genomické DNA

Pro izolaci genomické DNA byl zvolen izolační kit *InnuPREP Plant DNA Kit* firmy Analytik Jena AG s následujícím postupem:

1. Asi 500 mg čerstvého rostlinného materiálu (děložní listy) se společně s tekutým dusíkem rozdrtilo tloučkem ve vychlazené třecí misce (Obrázek 5a, b).
2. Homogenizovaný materiál (homogenizát; Obrázek 5c) se přenesl do eppendorfky a přidalo se 400 μ l lyzačního pufru SLS a 25 μ l proteinázy (Proteinase K).
3. Po důkladném zvortexování se vzorky umístily na vyhřívaný termoblok s třepačkou (30 min, 50 °C, 400 ot/min).
4. Poté se lyzát přefiltroval přenesením na „pre-filter“, který se umístil do 2,0 ml zkumavky (Receiver Tube) a zcentrifugoval se (1 min, 10 000 g).
5. Přidáním 5 μ l RNAsy do přefiltrovaného roztoku a následné 5 min inkubaci při pokojové teplotě se ze vzorku degradovala RNA.
6. Přidáním 200 μ l Binding Solution SBS do lyzovaného vzorku se odstranil filtr. Právě tento roztok, Binding Solution SBS, vytváří optimální podmínky pro navázání DNA z lyzátu na membránu v kolonce (Spin Filtr).
7. Po promíchání obou roztoků (opakovaným nasáváním pipetou) se vzorek přenesl na Spin Filter umístěný v nové 2,0 ml zkumavce.
8. Po centrifugaci (10 000 g, 2 min) se filtr promyl 500 μ l promývacího roztoku HS a znovu zcentrifugoval (10 000 g, 1 min).
9. Při druhém promývání se nanoslo 750 μ l promývacího roztoku MS a následně se provedla další centrifugace (10 000 g, 1 min).
10. Po přenesení Spin filtru na novou zkumavku se odstranily zbytky promývacích roztoků další centrifugací (2 min, 12 000 g). Eluce přečištěné DNA se zahájila přidavkem 200 μ l předeštěné sterilní destilované vody (50 °C) na Spin filtr umístěném ve sterilní 1,5 ml zkumavce Eppendorf.
11. Po inkubaci při laboratorní teplotě (1 min) se vzorek zcentrifugoval (8 000 g, 1 min).

Obrázek 5. Příprava homogenizátu v kapalném dusíku.



Úspěšné provedení izolace DNA se ověřilo pomocí 1% agarózové elektroforézy. Koncentrace a čistota extrahované DNA se stanovila pomocí spektrofotometru *Nanodrop ND-1000*. Po změření koncentrace se DNA naředila na požadovanou hodnotu. Pro AFLP analýzu byla DNA naředěna na 40 ng.μl⁻¹ a pro mikrosatelitní analýzu na 7 ng.μl⁻¹. Izolovaná DNA byla uchovávána v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

4.5 AFLP analýza

Pro vlastní AFLP analýzy byl použit originální protokol Vos et al. (1995), který byl upravený podle publikace Kitner et al. (2008). Všechny kroky vyžadující použití termálního cycleru byly prováděny na přístroji *Termocycler TC-XP* (Bioer) a vlastní separace AFLP produktů proběhla na přístroji *Thermo Scientific Owl Separation Systems S3S*.

4.5.1 Restrikce a ligace DNA

Prvním krokem je příprava a napipetování restrikčního mixu k DNA a inkubace na termobloku při 37 °C po dobu 2,5 hodiny. Před uplynutím této doby se připravil ligační mix, který se přidal k vzorkům po restrikci a následovala tříhodinová inkubace na termobloku při 37 °C.

Postup restrikce a ligace:

1. Vzorky DNA se rozmrazily přenesením do ledničky
2. Připravil se restrikční mix pro daný počet vzorků, zvýšený o objemy pro dva vzorky (ztráty při pipetování) (Tabulka 3)
3. Restrikční mix se promíchal a rozpipetoval po 15 μl do PCR stripů
4. Přidalo se 5 μl DNA (výsledný objem restrikční směsi byl 20 μl, směs se promíchala a krátce zcentrifugovala na stolní centrifuze
5. Stripy se přemístily do termocykleru a inkubace probíhala po dobu 2,5 hodiny při 37 °C
6. Asi 20 minut před ukončením restrikce se připravil ligační mix podle protokolu, který se následně promíchal
7. Po ukončení restrikční reakce se přidalo 5 μl ligačního mixu do PCR stripu z předchozího kroku (Tabulka 4)
8. Inkubace proběhla na termocykleru po dobu 3 hodin při 37 °C

Tabulka 3. Složení premixu pro restrikci

Restrikce	Objem v μl	
sterilní ddH ₂ O	12,790	} Objem roztoku pro pipetování je 15 μ l
pufr dodaný s EcoRI	2,000	
MseI	0,125	
EcoRI	0,063	
DNA	5,000	
PCR protokol: 37 °C; 2,5 hod	$\Sigma = 20 \mu$ l	

Tabulka 4. Složení premixu pro ligaci

Ligace	Objem v μl	
sterilní ddH ₂ O	3,0	} Objem roztoku pro pipetování je 5 μ l
pufr dodaný s ligázou	0,5	
MseI adaptor	0,5	
EcoRI adaptor	0,5	
T4 ligáza	0,5	
PCR protokol: 37 °C; 3 hod	$\Sigma = 5 \mu$ l	

4.5.2 Preselektivní amplifikace

Jako matrice pro PCR se používal neředěný produkt restrikce a ligace (Adaptor/Ligation Solution). Protokol přípravy PCR mixu a podmínky amplifikační reakce jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulky 5 a 6).

Tabulka 5. Složení premixu pro preselektivní amplifikaci

Preselektivní amplifikace	Objem v μl	
sterilní ddH ₂ O	11,85	} Objem roztoku pro pipetování je 18 μ l
pufr dodaný s polymerázou (5x)	4,50	
dNTP (10mM)	0,50	
EcoA*primer	0,50	
MseI*primer	0,50	
goTaq polymeráza (5 U/ μ l)	0,15	
Adaptor/Ligation solution	2,02	
	$\Sigma = 20,02 \mu$ l	

Tabulka 6. PCR protokol pro preselektivní amplifikaci

94 °C / 60 s	

94 °C / 30 s	← 20x opakování
56 °C / 60 s	
72 °C / 105 s	

72 °C / 300 s	
4 °C neomezeně	

Směs se po preselektivní amplifikaci 7x naředila (5 µl ligační směs + 35 µl ddH₂O). Takto zředěný roztok se použil jako matrice pro všechny selektivní PCR amplifikace. Zbytek nenaředeného vzorku se uchovával při – 80 °C.

4.5.3 Selektivní amplifikace

Protokol přípravy PCR mixu a podmínky amplifikační reakce v cycleru jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulky 7 a 8).

Tabulka 7. Složení premixu pro selektivní amplifikaci

<u>Selektivní amplifikace</u>	<u>Objem v µl (pro 1 vzorek)</u>	
sterilní ddH ₂ O	3,74	} Objem roztoku pro pipetování je 8 µl
Buffer (5x)	2,00	
dNTP (10mM)	0,20	
EcoA***primer	1,00	
MseI***primer	1,00	
goTaq	0,06	
preamplifikát (7x zřed')	2,02	
	Σ = 10,02 µl	

Takto připravený premix se dobře promíchal a rozpipetoval po 8 µl do PCR stripů a přidalo se 2,02 µl naředěného preamplifikátu.

Tabulka 8. PCR protokol pro selektivní amplifikaci

94 °C / 210 s	

94 °C / 30 s	← opakování 16x
60,1 °C / 30 s	
72 °C / 60 s	

94 °C / 30 s	
56 °C / 30 s	
72 °C / 60s	
4 °C neomezeně	

Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky připraveny pro elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu.

4.6 Mikrosatelity

Vedle AFLP analýzy byly pro studium genetické variability populací *L. aculeata* a *L. serriola* použity mikrosatelitní markery publikované pro *L. sativa* (Simko, 2009) a *L. serriola* (Riar et al., 2011). Výběr jednotlivých markerů a testování PCR provedl vedoucí diplomové práce v rámci jiné studie (Kitner et al., 2014). K analýzám bylo použito celkem 8 polymorfních lokusů, které jsou uvedené v následující tabulce (Tabulka 9).

Tabulka 9. Seznam testovaných mikrosatelitových lokusů (markerů).

Marker	EST/CGPDB	Primerová sekvence (5' → 3') (F/R)	Očekávané motivy a opakování	
			'Salinas'	'UC96US23'
SML-002	QGH4c05	F: GTGATTGCATGCCAAATGAA R: TTAGTAGCCCGCATGCTTTT	-	(TTC) ¹⁷
SML-039	Cntg-5632	F: ATTACCCCTGGCCTTATGCT R: TCGTATCTTGGCTGCTCCAT	(CCCCTT) ²	(CCCCTT) ¹
SML-045	Cntg-7478	F: ACAAACCGTTTCACCCAAA R: AGCCCTGTCCTCTTCAGGAT	(AAG) ⁹	(AAG) ¹²
SML-055	Cntg-3666	F: CTGCGTGTTTTAAAGCCGTTT R: TCCATAATAATATAATCGCACCAA	-	(TGA) ¹⁵ ...(ATG) ⁹
WSULs-18	CLR6885.b1_ J18.ab1	F: GAAGGTGGTGGGTTGCTGTC R: TGGGCAATTHCAGATTGAGA	-	(TCT) ¹³
WSULs-45	Cntg-2336	F: TTGCCACTCGAAGCCTTTACA R: CCCTTTCACCTCCGGTTAT	-	(GAT) ⁸
WSULs-75	Cntg-3635	F: GGATGGTGAGCTGGATCCTTT R: AAGTAGCATGGGCGCTGAAG	-	(TCT) ¹⁰
WSULs-163	Cntg-1938	F: ACTTTTGACAGCTTTGAGACTCG R: AGGCCATTGATGCCTTTAGTGA	-	(GA) ¹⁵

Tabulka mikrosatelitních markerů vyvinutých z EST sekvencí zveřejněných v CGPDB (*Compositae Genome Project Database*) zahrnuje sekvenci primerů (F - *forward* a R - *reverse*) vymezující úsek DNA, který má být amplifikován, očekávané motivy (Simko, 2009; Riar et al., 2011), název testovaného mikrosatelitního lokusu. Lokusy s označením SML (Salinas Microsatellites for Lettuce) byly publikovány v práci Simko (2009) a lokusy s označením WSULs v práci Riar et al. (2011).

4.6.1 Podmínky PCR reakce u mikrosatelitních markerů

PCR reakce probíhala v celkovém objemu 15 μl za použití goTaq Polymerázy (Promega, Madison, WI), 10 mM dNTPs a forward a reverse primerů o koncentraci 10 μM . Takto připravený Master Mix (Tabulka 10) se důkladně protřepal, ihned se po 13,8 μl rozpipetoval do stripů a nakonec se přidalo 1,22 μl templátové DNA (7 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

Připravené vzorky se zvortexovaly a vložily do předeřhátého termocykleru s definovaným teplotním profilem, kdy se v závislosti na konkrétním mikrosatelitu mění annealingová teplota i počet cyklů. Obecné schéma PCR profilu uvádí Tabulka 11. PCR podmínky (annealingová teplota, počet cyklů, doba separace) pro jednotlivé mikrosatelity shrnuje Tabulka 13. Všechny PCR reakce byly prováděny v *Termocycler TC-XP* (Bioer).

Tabulka 10. Složení Master Mixu pro PCR amplifikaci. Množství je uvedeno pro 1 strip, tj. 8 vzorků, kdy je počítáno i se ztrátami během pipetování.

Chemikálie pro 8 (10) vzorků	Objem (μl)
ddH ₂ O	98,2
Buff	30
dNTPs (10 mM)	3
Primer F (10 μM)	3
Primer R (10 μM)	3
goTaq Polymeráza	0,84

Tabulka 11. PCR profil pro SSR analýzu.

Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Doba (min)	
95 $^{\circ}\text{C}$ (iniciační denaturace)	2:00	} x cyklů
95 $^{\circ}\text{C}$ (denaturační teplota)	1:00	
T _A (annealingová teplota)	1:00	
72 $^{\circ}\text{C}$ (extenze)	0:30	
72 $^{\circ}\text{C}$ (finální extenze)	5:00	
10 $^{\circ}\text{C}$ (chlazení)	neomezeně	

T_A...Annealingová teplota

4.7 Separace a detekce PCR produktů

Postup elektroforetické separace a vizualizace DNA fragmentů, které byly výsledkem obou metod (AFLP i SSR) byl identický a provedla jsem jej na přístroji *Thermo Scientific Owl Separation System S3S* s rozměry skel 350 x 430 mm a 350 x 450 mm. K analýze byl použit 6% polyakrylamidový gel s tloušťkou 0,4 mm. Pracovní postup byl následující:

1. Velké sklo se nejprve ošetřilo saponátem a poté omylo pod vodovodní vodou a nakonec destilovanou vodou. Utřelo se papírovým ručníkem.
2. Malé sklo (s výřezem) se omylo pod vodovodní vodou, destilovanou vodou, otřelo se papírovým ručníkem a ošetřilo ethanolem a přípravkem na odpuzování vody (Rain Repellent).
3. Velké sklo, na kterém byl gel přilepený, se ošetřilo směsí kyseliny octové v 96% ethanolu (100 ml 96% ethanolu + 500 μ l kyseliny octové) a 3 – methakryloxypropyltrimethoxysilanu, které působí jako tzv. molekulární lepidlo a zajišťuje navázání polyakrylamidu na sklo. Vzniklá směs se rovnoměrně rozetřela po celé ploše skla a postup se 2-3x opakoval. Po 5 min od aplikace se sklo třikrát ošetřilo ethanolem a otřelo dosucha.
4. Na větší sklo se položily spacers, následně sklo s výřezem (skla byla přiložena ošetřenými stranami směrem k sobě) a obě skla se zafixovala k sobě svorkami.
5. Pro přípravu polyakrylamidové gelu se použilo 70 ml 6% roztoku akrylamidu, 467 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 46,7 μ l tetramethylethylendiaminu (TEMED).
6. Prostor mezi skly jsem naplnila roztokem gelu pomocí stříkačky a mezi skla jsem následně zasunula hřebínek (rovnou stranou do gelu zhruba 0,5 cm hluboko). Horní část skla s vloženým hřebínkem se zafixovala dalšími svorkami a ponechala 60 minut stát, aby gel zpolymeroval.
7. Po polymeraci gelu se odstranily svorky i hřebínek, skla se omyly a osušily papírovým ručníkem. Vyčištěná skla se připevnila do elektroforetické komůrky a zalila 0,5x TBE pufrem.
8. Připravená skla s gelem se umístily do elektroforézy T-Rex nahřáté minimálně na teplotu 45 °C. Separace fragmentů probíhala v 0,5x zředěném roztoku TBE pufre.
9. Před nanášením vzorků na gel se vzorky smíchaly s denaturačním pufrem obsahující formamid (polovina objemu PCR produktu) a byly denaturovány na termocycleru zahřátém na teplotu 96 °C po dobu 3 min. Po denaturaci se vzorky hned přenesly na chladicí blok, aby

se zabránilo zpětné renaturaci fragmentů DNA. Poté se vzorky nanášely do gelu pomocí osmikanálové pipety.

10. Během denaturace vzorků se vypnul zdroj stejnosměrného elektrického proudu, katodový (horní) prostor se otevřel a proudem pufru z injekční stříkačky se znovu vyčistil prostor mezi skly a následně se zasunul hřebínek.
11. Po 3 minutách se vzorky vytáhly z termocycleru do chladítka a nanesly se na gel. Po nanesení všech vzorků se uzavřel katodový prostor aparatura se připojila ke zdroji napětí (2200 V, 120 mA, 75 W).
12. Doba separace závisela na délkách rozdělovaných PCR produktů, obvykle 1 – 3 hodiny a řídila se pozicí bromfenolové modři (odpovídá pozici fragmentů určité délky).

Vizualizace elektroforetogramu:

1. Během elektroforetické separace se připravily 4 roztoky: FIX/STOP roztok (10% kyselina octová), 1% kyselina dusičná, 0,1% dusičnan stříbrný a vývojka (3% uhličitan sodný), která se umístila do lednice, aby se vychladila na teplotu nižší než 10 °C.
2. Po ukončení elektroforetické separace se vypnul zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojily se elektrody a vypustil pufr z katodové části. Poté se sklo vyjmul z elektroforetické komůrky, vysunuly se spacers a skla se pomocí nože od sebe oddělila.
3. Malé sklo s gelem se přeneslo do fotomisky na třepačku a zalilo se FIX/STOP roztokem. Po uplynutí 20 min se FIX/STOP roztok slil zpět do kádinky k dalšímu použití.
4. Sklo s gelem se 3x promylo v destilované vodě a následně přesunulo do roztoku 1% kyseliny dusičné na dobu 5 min a poté se opět 3x promylo v destilované vodě.
5. Barvení stříbrem probíhalo v 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného za přídavku 3 ml formaldehydu po dobu 35 min. Po uplynutí této doby se sklo na krátkou dobu (asi 5 s) ponořilo do destilované vody.
6. V dalším kroku se sklo s gelem vložilo do 3% roztoku uhličitanu sodného (vývojka na vyvolání latentního obrazu). Před použitím se do vývojky přidalo 2,25 ml formaldehydu a 300 µl thiosíranu sodného. Sklo s gelem se v tomto roztoku ponechalo tak dlouho, dokud se na gelu neobjevily zřetelné tmavo-hnědé proužky (tj. bandy, fragmenty DNA).
7. Jakmile byly bandy zřetelné a dostatečně tmavé, barvení se zastavilo přilítím FIX/STOP roztoku do vývojky. Sklo se v tomto roztoku ponechalo po dobu 5 min až do ustálení obrazu a poté se důkladně omylo v destilované vodě a vysušilo v sušičce při 60 °C po dobu 30 min.

8. Po vysušení gelu byl elektroforetogram vyhodnocen na negatoskopu. A nakonec nepotřebný gel byl odlepen od skla v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l^{-1} a sklo bylo umyto pro další použití.

4.8 Statistické hodnocení

4.8.1 Vyhodnocení gelů

Výsledné elektroforetogramy se hodnotily vizuálně na negatoskopu, kdy byly hodnoceny pouze jasné a dobře detekovatelné alely (tj. pruhy/bandy/markery – fragmenty naamplifikované DNA). Pro ověření reproducibility obou použitých metod bylo do analýzy zahrnuto i osm duplicitních položek.

AFLP metoda.

Na základě vyhodnocení absence/prezence bandů detekovaných u jednotlivých primerových kombinací byla sestavena v programu MsExcel matice binární dat, kdy 0 značila absenci a 1 prezenci sledovaného markeru/alely. Data v této podobě byla dále použita pro analýzu dat a vizualizaci získaných výsledků.

SSR metoda.

Amplifikované alely byly hodnoceny vizuálně. Jestliže byla v daném lokusu pozorována pouze jedna alela, byl genotyp označen za homozygotní. Pokud byly detekovány dvě alely, pak byl genotyp považovaný za heterozygotní. Takto byly pro každý lokus vizuálně stanoveny konstituce alel pomocí písmen, kdy písmenem A byla označena nejpomaleji migrující alela. Velikost (délka) amplifikovaných alel byla stanovena pomocí tzv. DNA žebříčku - standardu molekulových markerů (30-330 bp AFLP® DNA ladder). Takto získaná data byla použita pro výpočty indexů genetické variability. Následně byla mikrosatelitní data rovněž převedena do podoby binární matice, spojena s výsledky AFLP dat a výsledná matice sloužila jako vstupní formát pro vizualizaci vzájemných vztahů a strukturovanosti dat ve shlukovacích programech (viz. kapitola 4.8.3).

4.8.2 Analýza dat

Pomocí softwaru GeneALEX 6 (Peakall and Smouse, 2006) byly spočítány následující indexy genetické variability:

1. *procento polymorfních lokusů* (P%) - základní charakteristika genetické proměnlivosti, která udává podíl polymorfních lokusů z celkového počtu zkoumaných lokusů;
2. *počty privátních AFLP i SSR alel* (PA_{AFLP} , PA_{SSR}) – unikátní alely typické pro jednu populaci, které se nevyskytují v žádné jiné (Avisé, 2004);
3. *očekávaná heterozygotnost* (H_E) – představuje podíl očekávaných heterozygotů v populaci na základě alelických frekvencí a za předpokladu platnosti Hardy-Weinbergova zákona;
4. *pozorovaná heterozygotnost* (H_O) – představuje podíl heterozygotních jedinců v daném lokusu z celkového počtu pozorovaných jedinců. Tento index byl vypočítán pouze pro mikrosatelitní marker, z AFLP dat tento index nelze vypočítat.

Z této analýzy dat byly vyloučeny 3 vzorky *L. serriola*, protože byly do studie zařazeny pouze jako referenční skupina.

4.8.3 Vizualizace genetické struktury

Po převedení SSR dat do binární matice a jejich spojení s AFLP daty byla výsledná matice použita pro vizualizaci genetických vztahů a odvození genetické struktury mezi analyzovanými jedinci pomocí dvou přístupů – ve formě NeighborNetwork diagramu (program *SplitsTree 4.1*; Huson and Bryant, 2006) a Bayesovského shlukování (program *Structure 2.2.*; Falush et al., 2007).

Fylogenetické sítě Neighbor-Network (Bryant and Moulton, 2004) jsou jakousi obdobou klasických fylogenetických stromů založených na Neighbor-Joining algoritmu. Podávají lepší znázornění možných vztahů mezi analyzovanými vzorky, protože neposkytují jeden konkrétní výstup (fylogenetický strom), ale umožňují zobrazení případných konfliktních signálů nebo alternativních fylogenetických historií (Fitch, 1997). Jsou používány v případech, kdy lze očekávat výskyt hybridizace, horizontálního přenosu genů, rekombinace apod. (Huson and Bryant, 2006).

Program BAPS pracuje na základě Bayesiánské statistiky. Tímto přístupem lze odhalit skrytou populační substrukturu přiřazováním jedinců do geneticky rozlišitelných skupin na základě frekvence alel a vazebné nerovnováhy (Bartáková, 2013). Soubor jedinců je rozdělen do K skupin (klastrů, hypotetických populací nalezených programem) na základě jejich genotypu tak, aby se dosáhlo co nejlepší Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Byl použit *admixture model*, který u každého

jedinice zobrazuje, zda jeho genotyp lze zařadit pouze do jedné nebo více skupin. Bylo provedeno 20 nezávislých běhů programu, kdy bylo testováno rozdělení studovaného souboru vzorků pro $K = 1-20$.

5 VÝSLEDKY

5.1 AFLP analýza

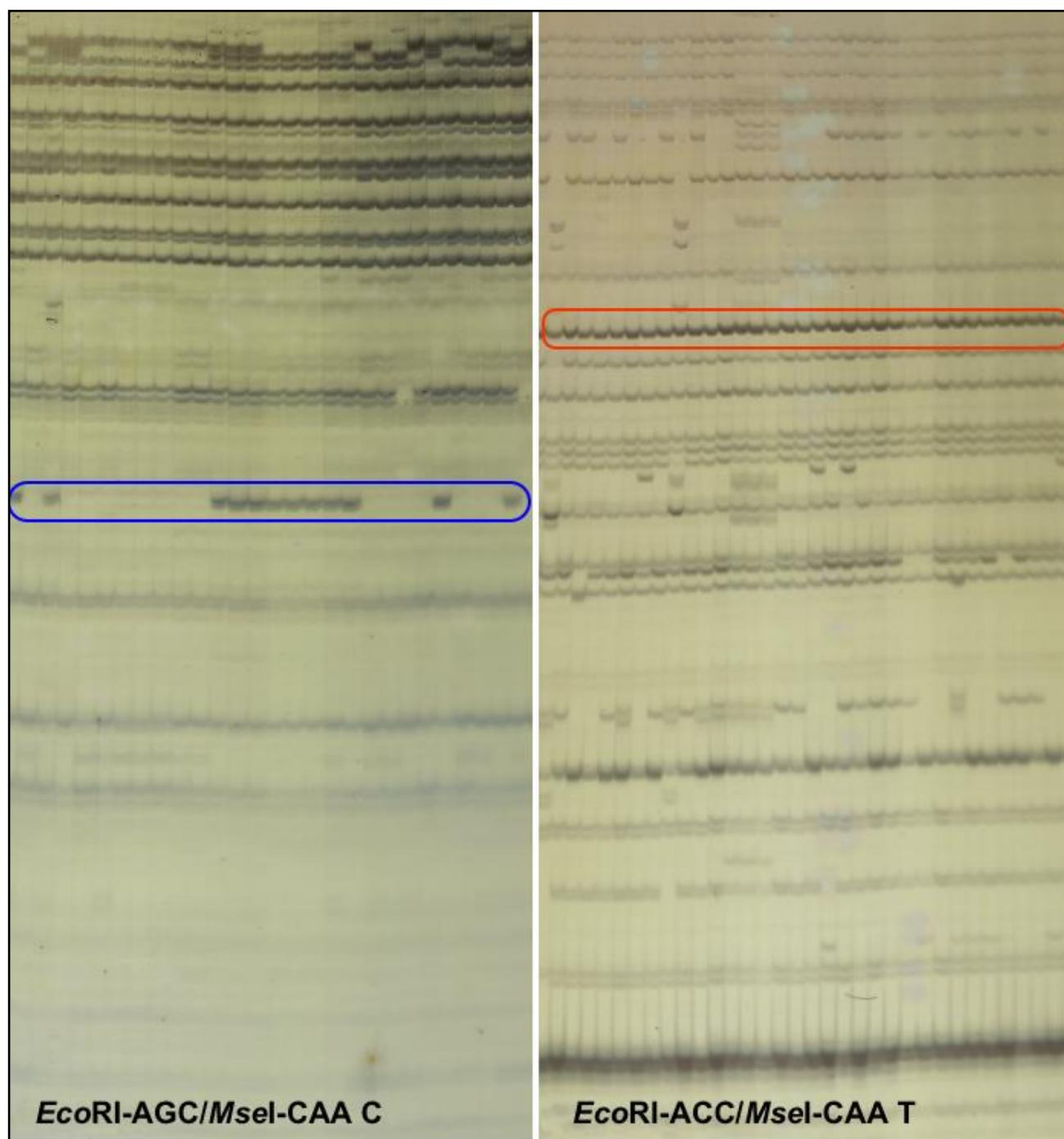
Ze sedmi primerových kombinací se 3 – 4 selektivními nukleotidy bylo získáno celkem 287 markerů, z nichž 209 bylo polymorfních (71,2 %). Použité primerové kombinace, počet AFLP fragmentů a stupeň polymorfismu ukazuje následující tabulka (viz. Tabulka 12).

Tabulka 12. Použité primerové kombinace a počty AFLP fragmentů. **Loc**, celkový počet AFLP markerů; **Loc_P**, počet polymorfních markerů; **P (%)**, polymorfismus - podíl polymorfních markerů.

Primerová kombinace	Loc	Loc_P	P (%)
E - AGC M - CTG	58	43	74,1
E - AGC M - CAAC	47	31	65,9
E - AGC M - CGAT	46	33	71,7
E - ACC M - CGAT	34	24	70,6
E - ACC M - CGATC	30	21	70,0
E - ACC M - CAAC	16	10	62,5
E - ACC M - CAAT	56	47	83,9
Celkem	287	209	71,2

Z předcházející tabulky (Tabulka 12) vyplývá, že nejvyšší počet bandů (58) byl detekován u primerové kombinace *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTG, zatímco nejmenší počet byl nalezen u kombinace *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAAC (16 bandů). Hodnoty P (%), podíl polymorfních markerů, se pohybovaly v rozmezí od 62,5 % (u primerové kombinace *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAAC) do 83,9 % (kombinace *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAAT). Souhrn základních indexů genetické diverzity na základě AFLP dat shrnuje Tabulka 15. Podíl polymorfních lokusů (P %) pro *L. aculeata* se pohyboval v rozmezí 23 % pro tureckou populaci do 59,93 % pro izraelské populace. Z celkového počtu 287 bandů bylo nalezeno celkem 32 privátních alel (PA_{AFLP}). Pro tureckou populaci to bylo 6 privátních alel, pro jordánské populace 2 alely a 24 pro izraelské populace. Hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E) byly 0,077 pro vzorky původem z Turecka, 0,074 pro vzorky z Jordánska a 0,125 pro vzorky z Izraele.

Obrázek 5. Elektroforetogramy AFLP markerů s primerovou kombinací *EcoRI*-AGC/*MseI*-CAA C s ukázkou polymorfního lokusu (vyznačen modře) a také *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAA T s příkladem monomorfního lokusu (vyznačen červeně).



5.2 SSR analýza

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem osm polymorfních markerů; *SML-002*, *SML-039*, *SML-045*, *SML-055*, *WSULs-18*, *WSULs-45*, *WSULs-75* a *WSULs-163* (Simko, 2009; Riar et al., 2011).

Tabulka 13. Následující tabulka shrnuje použité PCR podmínky u jednotlivých mikrosatelitových lokusů pro druh *L. aculeata*, tj. teplotu annealingu (T_A), počet cyklů a dobu separace.

Mikrosatelitový lokus (marker)	Annealingová teplota (T_A ; °C)	Počet cyklů (c)	Doba separace (min)
SML-002	57,5	34	155
SML-039	65,7	33	160
SML-045	62,5	33	160
SML-055	60,0	33	165
WSULs-18	63,0	28	170
WSULs-45	64,5	30	170
WSULs-75	63,5	30	160
WSULs-163	63,8	30	165

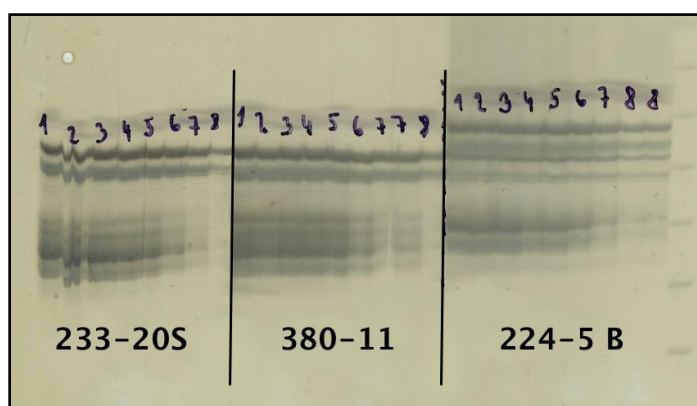
Tabulka 14. Zjištěné charakteristiky analyzovaných mikrosatelitů. Tabulka ukazuje počet detekovaných alel (N_A), jejich velikost (bp) a také polymorfní informační obsah (PIC).

Mikrosatelitový lokus (marker)	Počet alel (N_A)	Velikost alel (bp)	PIC (%)
SML-002	9	167 – 207	22,7
SML-039	2	232 – 237	9,9
SML-045	6	214 – 258	16,3
SML-055	6	212 – 240	32,6
WSULs-18	8	209 – 243	51,2
WSULs-45	3	184 – 189	28,5
WSULs-75	4	173 – 188	17,1
WSULs-163	6	178 – 196	24,2

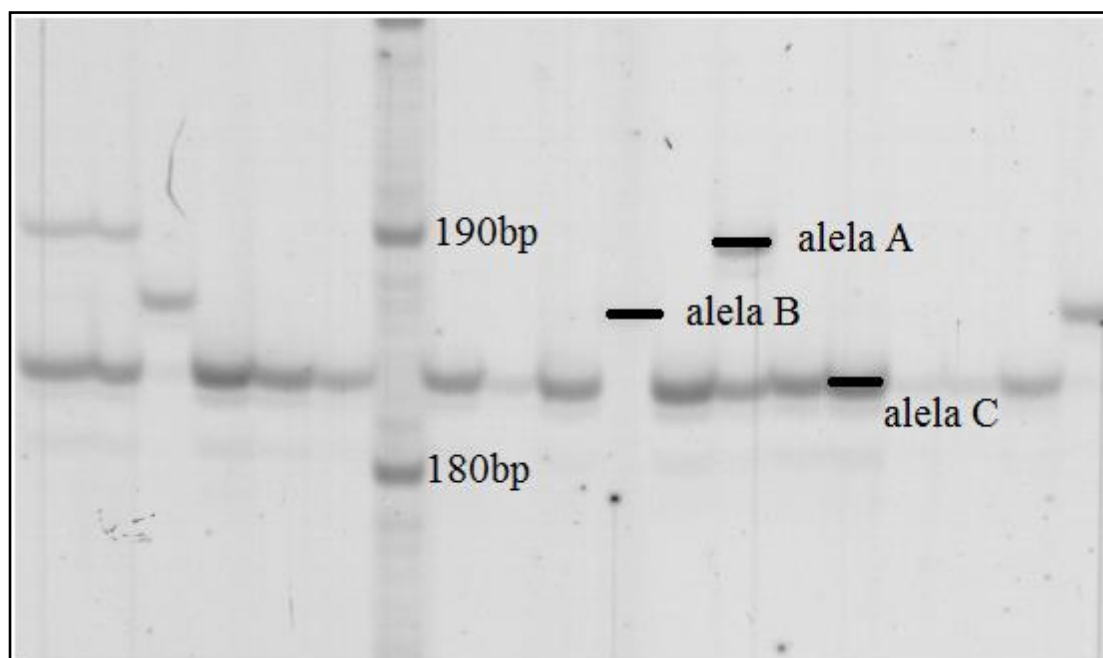
Jelikož SSR lokus *SML-039* nebyl za daných PCR podmínek dobře hodnotitelný, byla k odvození správné annealingové teploty provedena tzv. gradientová PCR. K jejímu provedení je nutný termocycler umožňující nastavení teplotního gradientu v druhé fázi PCR reakce, při níž nasedají primery. Obecně platí, že při vyšší annealingové teplotě se zvyšuje specifčnost nasedání primeru ke komplementární sekvenci a ve výsledku můžeme získat přesnější a lépe hodnotitelný výsledek PCR amplifikace (ideálně ve formě jednoho dobře hodnotitelného bandu). Rozmezí annealingových teplot bylo nastaveno od 57,2 °C až do 65,7 °C. Optimalizace byla provedena na třech vzorcích (233-20S, 380-11 a 224-5B). Pro analýzu celého souboru byla vybrána teplota 65,7 °C (jamky označené číslem 8). Výsledek separace PCR produktů po provedení gradientové PCR ukazuje Obrázek 6. Pro dosažení lepšího elektroforetického záznamu byla nutná optimalizace i u dvou dalších lokusů *WSULs-18* a *WSULs-163*.

U lokusu *WSULs-45* byly detekovány 3 vzorky s tzv. nulovou alelou (viz. str. 22 – Problémy při vyhodnocování PCR produktů). Navzdory několikačetným opakováním PCR reakcí a elektroforetickým separacím (např. zvyšováním koncentrace templátové DNA) nebylo dosaženo vizualizace alely. Konkrétně se jednalo o vzorky 233-17, 366-9 a 373-22.

Obrázek 6. Elektroforetogram mikrosatelitu s označením *SML-039* zachycující optimalizaci annealingové teploty u vzorků 233-20S, 380-11 a 224-5B. Čísla 1-8 označují pořadí jamek v PCR stripu umístěného v gradientu 57,2 °C (1. jamka) až 65,7 °C (8. jamka).



Obrázek 7. Elektroforetogram a konstituce mikrosatelitového lokusu *WSULs-45*. Obrázek zachycuje 3 alely, které byly detekovány pro tento lokus. Na elektroforetogramu jsou pod hlavní alelou patrné stutter (stínové) bandy.



Pomocí osmi polymorfních lokusů bylo detekováno celkem 44 alel. Počty alel detekovaných na jednom lokusu se pohybovaly v rozmezí od 2 do 9. U lokusu *SML-002* bylo detekováno 9 alel (167-207 bp), 2 alely (232-237 bp) u *SML-039*, 6 alel (214-258 bp) u *SML-045*, 6 alel (212-240 bp) u *SML-055*, 8 alel (209-243 bp) u *WSULs-18*, 3 alely (184-189 bp) u *WSULs-45*, 4 alely (173-188 bp) u *WSULs-75* a 6 alel (178-196 bp) u *WSULs-163*. Nejnižší hodnota polymorfního informačního obsahu (PIC) byla 9,9 % u lokusu *SML-039*, zatímco nejvyšší u lokusu *WSULs-18* (51,2 %).

Z následující tabulky (Tabulka 15) je patrné, že nejvyšší procento polymorfních lokusů (P %) bylo zaznamenáno u populací z Izraele (70,0 %), u populací z Jordánska 38,0 % a nejmenší u populace z Turecka (26,0 %). Očekávaná heterozygotnost (H_E) pro tureckou populaci byla 0,305, pro izraelskou 0,229 a jordánskou 0,164. Průměrné hodnoty pozorované heterozygotnosti u jednotlivých populací byly 0,141, 0,100 a 0,085 (řazeno sestupně pro jordánské, turecké a izraelské vzorky). V turecké populaci bylo nalezeno 5 privátních alel, v jordánské 2 a nejvíce jich bylo v izraelské, a to 17 privátních alel.

Tabulka 15. Souhrn genetické diverzity 72 vzorků *L. aculeata* založené na 287 AFLP a 8 EST-SSR lokusech pro 19 populací pocházejících z Turecka, Jordánska a Izraele. **N**, počet vzorků; **P (%)**, procento polymorfních lokusů; **PA_{AFLP}**, privátní AFLP alely; **PA_{SSR}**, privátní mikrosatelitové alely, **H_E(SE)**, očekávaná heterozygotnost; **H_O**, pozorovaná heterozygotnost; **SE**, střední chyba průměru.

Populace	AFLP				SSR			
	N	P (%)	PA _{AFLP}	H _E (SE)	P (%)	PA _{SSR}	H _O	H _E (SE)
Turecko	5	23,00	6	0,077 (0,009)	26	5	0,100	0,305 (0,072)
Jordánsko	17	37,28	2	0,074 (0,009)	38	2	0,141	0,164 (0,038)
Izrael	50	59,93	24	0,125 (0,010)	70	17	0,085	0,229 (0,069)

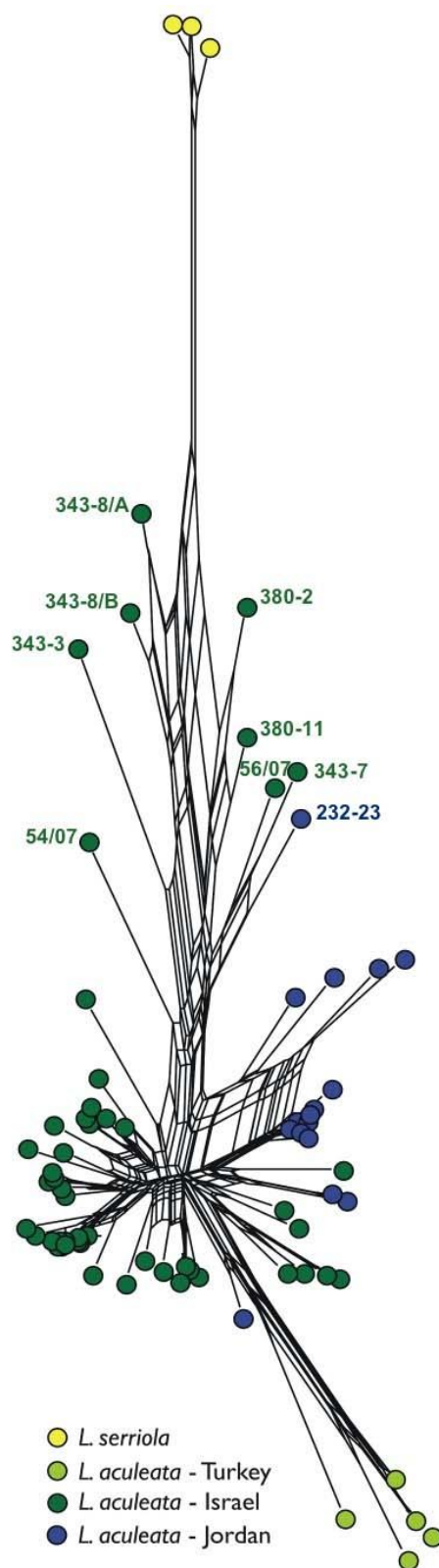
5.3 Vizualizace vzájemných vztahů mezi analyzovanými vzorky

Pro grafické znázornění vzájemných vztahů mezi analyzovanými vzorky byly použity dva přístupy - tvorba fylogenetické sítě NeighborNetwork a Bayesovské shlukování. Ke konstrukci NeighborNetwork diagramu (Obrázek 8) byly použity spojené výsledky získané pomocí obou molekulárních markerů na základě presence/absence alel. Z diagramu je patrné, že se vzorky *L. aculeata* vyčlenily do 3 skupin. První skupinu, více geneticky odlišnou od ostatních populací, tvořily vzorky *L. aculeata* pocházející z Turecka (světle zeleně zvýrazněné vzorky v Obrázku 8). Fenotyp položek z Turecka odpovídal popisu druhu *L. aculeata* s tím, že okraj stonkových listů byl u těchto položek výrazněji zubatý než u položek z Izraele a Jordánska (doc. Eva Křístková, ústní sdělení). Druhá skupina sdružovala vzorky pocházející jak z Izraele, tak i ze sousedního Jordánska (tmavě zelená a modrá barva). Třetí skupina představuje “hybridní zónu” umístěnou v oblasti mezi typickými položkami *L. aculeata* a 3 položkami *L. serriola*. Tato zóna obsahuje jednak tři vzorky 343-8/A, 343-8/B, 54/07, u kterých byl hybridní původ prokázán již v předchozí studii provedené na základě isoenzymové analýzy (Lebeda et al., 2012), a rovněž dalších šest vzorků (380-2, 380-11, 232-23, 343-3, 343-7 a 56/07). Některé z těchto rostlin vykazovaly morfologické znaky, které naznačují jejich možný hybridogenní původ. Pro druh *L. aculeata* jsou typické celistvé stonkové listy, avšak u rostliny 380-2 se vyskytovaly stonkové listy dělené (Kitner et al., 2014). Naopak

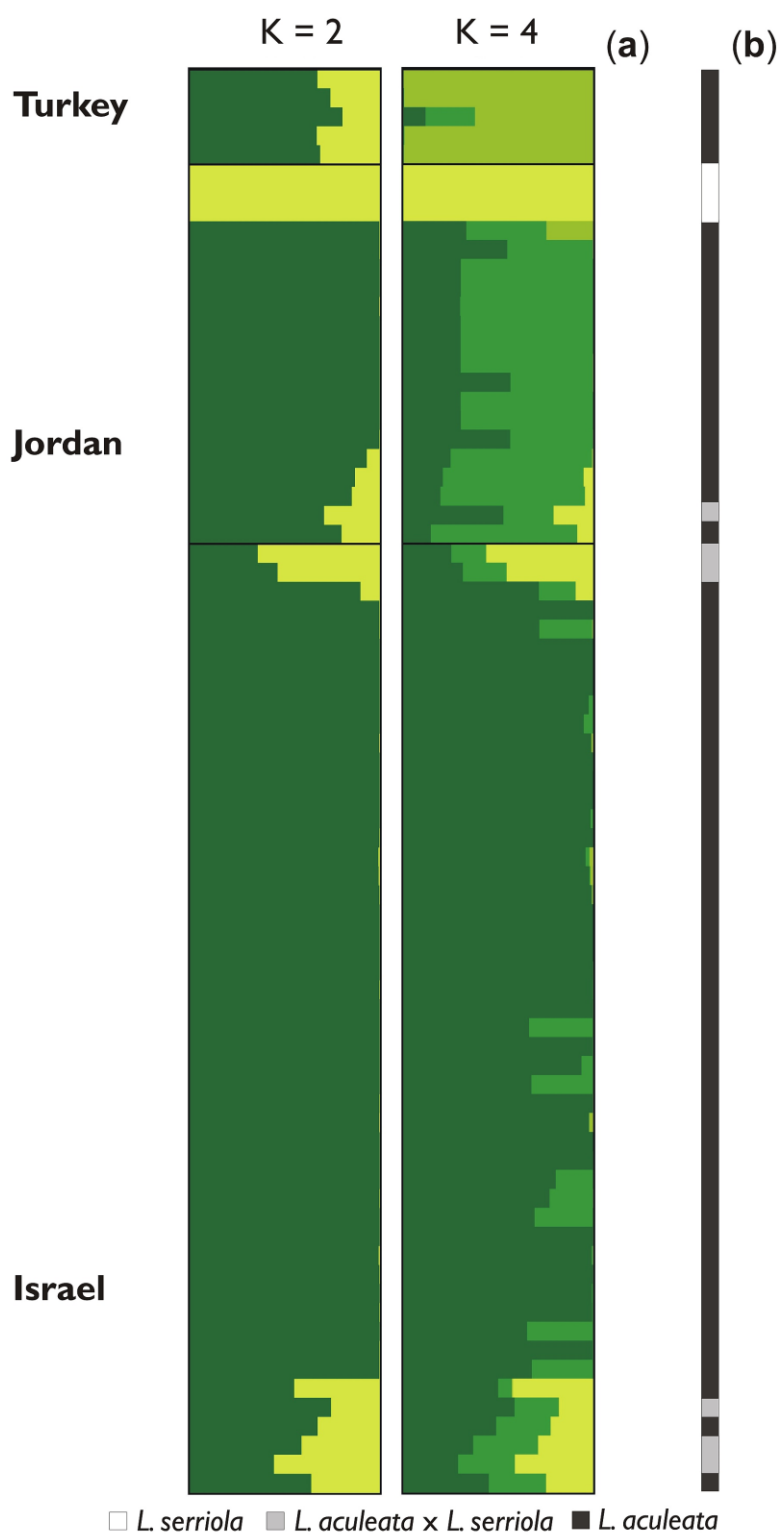
rostlina 380-11 měla listy celistvé, ale byly u ní pozorovány zajímavé detaily na stonkových trichomech (např. žlutavé vybarvení jejich báze a malá variabilita v délce a tloušťce) (Kitner et al., 2014). U položek 232-23, 343-3, 343-7 a 56/07 nebyly pozorovány morfologické odchylky od standardního popisu druhu *L. aculeata* (doc. Eva Křístková, ústní sdělení).

Rozdělení vzorků na základě jejich geografického původu a taxonomické determinace podpořil i výstup Bayesovské analýzy (Obrázek 9a). Program BAPS našel optimální rozdělení vzorků do dvou, popřípadě čtyř skupin. Pro $K = 2$ se výrazně vyčleňují genotypy charakteristické pro druh *L. aculeata* (tmavě zelená barva u většiny vzorků z Jordánska a Izraele), *L. serriola* (světle zelená barva tří vzorků z Jordánska) a část položek naznačující jejich mezidruhový původ (vzorky z Turecka a menší podíl vzorků z Jordánska a Izraele). Toto tvrzení je následně zpřesněno výsledky pro $K = 4$, kde se jasně odlišují vzorky z Turecka od vzorků z Jordánska a Izraele. Dále se ukazuje podobný charakter jordánských a izraelských vzorků, což je zřejmé asi z 20-30% zastoupení genotypu charakteristického pro rostliny s "čistým" *L. aculeata* profilem z Izraele v profilech jordánských vzorků. Z diagramu pro $K = 4$ je rovněž zřejmé, že u části vzorků z Jordánska a především Izraele jsou přítomny světle zelené profily odpovídající položkám *L. serriola*. Tento diagram je doplněn o výsledky morfologické determinace vzorků (Obrázek 9b), kde černá barva označuje rostliny s charakterem typickým pro druh *L. aculeata*, bílá barva označuje rostliny s charakterem typickým pro *L. serriola* a nakonec šedou barvou jsou zvýrazněni potenciální hybridy *L. aculeata* x *L. serriola* (Jemelková et al., 2013).

Obrázek 8. Neighbor Network diagram vytvořen na základě AFLP a SSR dat 72 položek z 19 populací *L. aculeata* a 3 položek *L. serriola*. Vzorky s hybridním charakterem byly v diagramu označeny číslem dané položky (viz. Tabulka 1).



Obrázek 9. Výsledky Bayesovské analýzy, založené na spojených výsledcích AFLP a SSR dat (a), společně s poskytnutými výsledky morfologického hodnocení (b).



6 DISKUZE

Je známo, že intenzivní šlechtění přineslo v posledních letech ztrátu některých cenných vlastností a v současnosti kultivary *L. sativa* vykazují omezenou genetickou diverzitu. V důsledku toho chybí efektivní zdroje pro zlepšování jejich vlastností. Současný trend ve šlechtění kulturního salátu (*L. sativa* L.) je založen na využití jeho planě rostoucích příbuzných druhů. K využití planých druhů při hybridizaci a při případném šlechtění je potřeba dobré znalosti o jejich genetické struktuře. Ačkoliv *L. aculeata* představuje jeden z planých druhů, který by mohl tvořit užitečný zdroj genů pro šlechtění, je tento druh stále nedostatečně studován a informace o jeho variabilitě jsou neúplné (Lebeda et al., 2004). Do dnešní doby bylo publikováno jen několik málo studií analyzujících druh *L. aculeata* (Koopman et al., 1998, 2001; Doležalová et al., 2002a, b). Prozatím nejobsáhlejší studie zabývající se variabilitou tohoto druhu byly provedeny v pracovní skupině prof. Aleše Lebedy na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci. V roce 2012 byly publikovány studie Lebeda et al. (2012), ve které bylo pomocí isoenzymové analýzy hodnoceno celkem 13 populací čítající 31 položek původem z Izraele. Další studie byla publikována v loňském roce (Kitner et al., 2014) a zaměřuje se na srovnání struktury populací *L. aculeata* s populacemi *L. saligna* a *L. serriola* v Izraeli. V přípravě je publikace Jemelková et al. (in prep), mimojiné vycházející i z výsledků získaných v této diplomové práci.

Praktická část předkládané diplomové práce se zaměřuje na molekulární analýzu druhu *L. aculeata* využívající dva DNA markery, a to AFLP a mikrosatelity, které představují užitečný nástroj k posouzení rozdělení genetické informace uvnitř i mezi populacemi. Metoda AFLP ve srovnání s mikrosatelity podává detailnější informace o genetické struktuře analyzovaných položek, ačkoliv Meudt a Clarke (2007) uvádí, že za předpokladu použití dostatečného počtu hodnocených AFLP bandů a mikrosatelitových lokusů (5–20) jsou výsledky srovnatelné.

Molekulární analýza byla provedena na souboru genofondových položek obsahující celkem 75 vzorků, kde bylo zahrnuto 69 položek *L. aculeata*, dále 3 položky *L. serriola* a 3 hybridní položky *L. aculeata* × *L. serriola*. Tyto genofondové položky byly sesbírány na 19 přirozených populacích v Izraeli, Jordánsku a Turecku.

Pro AFLP analýzu bylo použito celkem sedm primerových kombinací, kterými bylo získáno celkem 287 markerů, z nichž 71,2 % bylo polymorfních. Nejvíce polymorfní byla primerová kombinace *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAAT, kde byl stupeň polymorfismu 83,9 %, naopak nejméně polymorfní byla kombinace *EcoRI*-ACC/*MseI*-CAAC (62,5 %), kde z celkového počtu 16 detekovaných lokusů bylo polymorfních 10. Nejvyšší procento polymorfních lokusů (P %) bylo zaznamenáno u populace z Izraele (59,93 %), zatímco nejmenší u populace z Turecka (23,0 %).

Očekávaná heterozygotnost (H_E) pro tureckou populaci byla 0,077, pro jordánskou 0,074 a izraelskou 0,125.

Vedle AFLP metody byla v rámci práce provedena také SSR analýza 8 polymorfních lokusů, a to *SML-002*, *SML-039*, *SML-045*, *SML-55* (Simko, 2009) a *WSULs-18*, *WSULs-45*, *WSULs-75* a *WSULs-163* (Riar et al., 2011). Podmínky PCR reakcí byly optimalizovány pro každý SSR lokus zvlášť, s rozsahem annealingových teplot od 57,5 °C do 65,7 °C, s počtem cyklů od 28 do 34 a dobou separace okolo 2,5 hod (155 - 170 min). Nejvíce polymorfní byl lokus *SML-002* s 9 detekovanými alelami, následovaný lokusem *WSULs-18* s 8 alelami. U lokusů *SML-045*, *SML-055* a *WSULs-163* bylo detekováno shodně po 6 alelách. Nejméně polymorfní byl lokus *SML-039* se 2 alelami. U stejných mikrosatelitních lokusů Simko (2009) udává 7 alel u *SML-002*, 4 alely u *SML-039*, 8 alel u *SML-045*, 7 alel u *SML-055*. Riar et al. (2011) uvádí následující hodnoty: 9 alel u *WSULs-18*, 10 alel u *WSULs-45*, 8 alel u *WSULs-75* a 6 alel u *WSULs-163*. Zajímavé je, že počty alel u jednotlivých lokusů detekovaných v této práci pro druh *L. aculeata* se výrazněji neliší od zjištěných charakteristik pro druhy *L. sativa* (Simko, 2009) a *L. serriola* (Riar et al., 2011). To vypovídá o převoditelnosti EST-SSR markerů mezi blízkými příbuznými druhy. Zároveň jsou tyto markery dostatečně variabilní pro provedení populačně genetických studií.

U studovaného souboru položek *L. aculeata* byly zjištěné nízké hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O), což odpovídá autogamní povaze studovaného druhu. Nejvyšší pozorovaná heterozygotnost 0,141 byla zjištěna u položek pocházejících z Jordánska, naopak nejnižší byla u izraelských populací (0,085). Pomocí isoenzymové analýzy zjištěná hodnota byla 0,003 (Lebeda et al., 2012). Kitner et al. (2014) popisuje u šesti populací tří různých planě rostoucích locik rovněž nízké hodnoty H_O , a to v rozmezí 0,008–0,066, přičemž u druhu *L. aculeata* byly hodnoty 0,011 a 0,014. Tyto hodnoty jsou o něco nižší, což může to být způsobeno použitím vyššího počtu SSR markerů, použitím jiných SSR markerů detekujících menší úroveň vnitrodruhové variability (*SML-001*, *SML-019*, *WSULs-25*, *WSULs-153*, marker *SML-002* nebyl analyzován) nebo tento rozdíl může být zapříčiněn také rozdílným počtem analyzovaných položek.

Vizualizací získaných dat pomocí NeighborNetwork diagramu se studované populace *L. aculeata* rozdělily do tří skupin. První skupinu tvořily turecké vzorky *L. aculeata*, které vykazovaly odlišný genetický charakter než zbývající vzorky z Izraele a Jordánska. Jejich fenotyp odpovídal popisu druhu *L. aculeata* s tím, že okraj stonkových listů byl u těchto položek výrazněji zubatý než u položek z Izraele a Jordánska (Kitner et al., 2014).

Druhá skupina byla tvořena vzorky původem jak z Izraele, tak i ze sousedního Jordánska. Genetické profily položek pocházejících z těchto států vykazovaly velmi podobný charakter, což by mohlo poukazovat na možný *gene flow* mezi těmito populacemi nebo na kratší čas, který uplynul od

vzájemného oddělení izraelských a jordánských populací, a časově ještě vzdálenějšímu oddělení populace z Turecka. Rozdílnost prostorově výrazně vzdálených populací *L. saligna* pocházejících ze čtyř evropských států (Česká republika, Francie, Itálie, Portugalsko) a tří blízkovýchodních států (Turecko, Izrael, Jordánsko) byla prokázána rovněž metodou AFLP (Kitner et al., 2008). Naopak struktura populací *L. aculeata*, které rostou v relativně krátké vzdálenosti, nemusí být zcela jasně oddělena, tak jako bylo zjištěno u (podobně vzdálených) populací příbuzných druhů *L. serriola* nebo *L. saligna* (Kitner et al., 2014).

Lebeda et al. (2012) pomocí isoenzymové analýzy hodnotil identickou sadu izraelských položek *L. aculeata*, rozšířenou v rámci této práce o sedm položek populace 367 a třináct položek populace 380. Výsledky isoenzymové analýzy ukázaly, že izraelské populace jsou velmi homogenní s relativně nízkou hodnotou genetického polymorfismu (až 75 % položek bylo seskupeno v jednom clusteru), což bylo potvrzeno i srovnáním spojených AFLP a SSR dat v této diplomové práci (80 % položek). Zjištěná hodnota očekávané heterozygotnosti pro izraelskou populaci byla na základě isoenzymové analýzy nižší ($H_E = 0,003$; Lebeda et al., 2012) než hodnoty dosažené v této práci. Hodnota získaná pomocí AFLP dat byla $H_E = 0,125$ a pomocí SSR markerů $H_E = 0,229$. Rozdíly ve zjištěných hodnotách lze vysvětlit různým charakterem jednotlivých markerů, počtem analyzovaných položek a rovněž v rozsahu H_E , které jsou rozdílné pro kodominantní (hodnoty v rozsahu 0-1) a dominantní markery (v rozsahu 0–0,5). Výpočet H_E se provádí podle Hardy-Weinbergova zákona, přičemž u kodominantních markerů je frekvence recesivní i dominantní alely známá (alely vidíme přímo na gelu). U AFLP markerů se výpočet provádí nepřímou – podle přítomnosti daného markeru se odvozuje frekvence dominantní alely, a potažmo i frekvence recesivní alely a následně hodnota heterozygotnosti, která dosahuje maximální hodnoty 0,5. Zjištěné hodnoty heterozygotnosti AFLP a SSR markerů se dají označit jako střední až vyšší a odráží schopnost obou markerů detekovat vyšší úroveň variability ve srovnání s isoenzymy, které jsou obecně považovány za málo variabilní marker. Dá se říci, že tyto poměrně vysoké hodnoty heterozygotnosti jsou překvapivé, s ohledem na samosprašnost převažující u rodu *Lactuca*. Je však nutné upozornit, že se nejedná o hodnoty vypočítané pro reálné populace (ve smyslu analýzy genetické variability jedinců koexistujících na konkrétní lokalitě), ale o výpočty variability jedinců pocházejících z rozsáhlejší oblasti a obsahující jedince sesbírané z různých reálných populací. Hodnoty heterozygotnosti reálných populací u různých druhů rodu *Lactuca* se pohybují v rozmezí 0,004–0,077 pro AFLP a 0,085–0,374 pro SRR markery (Kitner et al., 2014), pro druh *L. aculeata* byly zjištěny hodnoty 0,004 a 0,029 pro AFLP marker, kdežto 0,085 a 0,143 pro mikrosatelity.

Třetí skupina položek, která se vyčlenila na NeighborNetwork i BAPS diagramu, představuje “hybridní zónu” mezi typickými položkami *L. aculeata* a *L. serriola* (224-5, 224-5A, 224-5B). Díky

zařazení vzorků *L. serriola* do analýzy, byla potvrzena již dřívější determinace třech hybridních položek (343-8/A, 343-8/B, 54/07), které byly původně sesbírány a určeny jako *L. aculeata*, ale po detailní morfologické a isoenzymové analýze, byly přehodnoceny jako hybridní (Lebeda et al., 2012). Dále bylo v této zóně detekováno dalších šest položek s hybridním charakterem, a to 56/07, 232-23, 343-3, 343-7, 380-2 a 380-11. V práci Lebeda et al. (2012) byly popsány odlišné znaky *L. aculeata* × *L. serriola* (343-8/A, 343-8/B, 54/07) od “klasických” vzorků *L. aculeata* (376-15) a *L. serriola* (377-8). Jedním z rozdílných znaků, které se u hybridního vzorku 343-8A vyskytly, bylo antokyanové zbarvení na bazální části stonkových trichomů (Lebeda et al., 2012). U položek 367-10, 232-23, 343-3, 343-7 a 56/07 nebyly pozorovány morfologické odchylky od standardního popisu druhu *L. aculeata* (doc. Eva Křístková, ústní sdělení). Poměrně zajímavé jsou vzorky i 380-2 a 380-11 vykazující odchylky jak po morfologické (dělené listy u 380-2; znaky na stonkových trichomech u 380-11), tak po stránce genetické. Tyto rostliny byly analyzovány souběžně i v rámci studie Kitner et al. (2014) zabývající se genetickou variabilitou a strukturou populací tří planých druhů salátů (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. aculeata*) pocházejících z přirozených stanovišť Blízkého východu. U druhu *L. aculeata* bylo analyzováno 21 rostlin pocházejících ze dvou populací (8 a 13 rostlin), které byly od sebe vzdáleny 18,1 km. Zatímco u jedné populace (367) byla zjištěná poměrně malá morfologická i genetická variabilita, druhá populace (380) vykazovala poměrně vysokou variabilitu a u dvou rostlin této populace byl nalezen vysoký počet mikrosatelitních lokusů s heterozygotní konstitucí alel. Některé z těchto “výjimečných” alel nebyly nalezeny u ostatních analyzovaných položek *L. aculeata*, ale byly identické s alelami nalezenými u položek *L. serriola*. Konkrétně se jednalo právě o vzorky 380-2 a 380-11. Autoři tímto poskytují důkazy o existenci mezidruhové hybridizace *L. aculeata* × *L. serriola* v přirozených populacích na Blízkém východě, kde vedle sebe společně rostou *L. aculeata*, *L. serriola* (Beharav et al., 2012; Lebeda et al., 2012; Kitner et al., 2014).

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá analýzou genetické variability kolekce genových zdrojů *Lactuca aculeata*, která je součástí Pracovní kolekce rodu *Lactuca* L. Katedry botaniky PřF UP v Olomouci.

V teoretické části této diplomové práce jsem se zabývala zpracováním doposud publikovaných informací týkajících se planého druhu *L. aculeata*, jeho morfologií, taxonomií, geografickým rozšířením a také vztahem ke kulturnímu salátu *L. sativa*. V další kapitole jsem se zabývala DNA markery, které jsou v současné době využívány při studiu rodu *Lactuca* L. Zejména jsem se soustředila na metodu AFLP (polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů) a mikrosatelitních markerů (SSR), které jsem použila ke genetické charakterizaci studovaného souboru.

V praktické části jsem pomocí 287 AFLP markerů a osmi polymorfních mikrosatelitových lokusů analyzovala 72 vzorků *L. aculeata* pocházející z Turecka, Jordánska a z Izraele a 3 vzorky *L. serriola* pocházející z Jordánska. PCR produkty byly podrobeny elektroforetické separaci v polyakrylamidovém gelu a vzniklé elektroforetogramy byly vyhodnoceny. Vzájemné vztahy mezi analyzovanými vzorky jsem vizualizovala pomocí NeighborNetwork diagramu a Bayesovské shlukovací analýzy, kde se vzorky seskupily podle svého geografického původu. Potvrdila jsem správnost dřívější determinace položek *L. aculeata*, *L. serriola* a tří hybridních položek *L. aculeata* × *L. serriola*. Kromě těchto tří položek *L. aculeata* × *L. serriola* bylo nově detekováno nejméně dalších šest položek s hybridním charakterem.

Výsledky této diplomové práce prohlubují informace a znalosti o variabilitě planých druhů a genových zdrojů v rámci rodu *Lactuca*. Výsledky byly prezentovány v roce 2013 ve formě posterové prezentace na mezinárodní konferenci “Wild Plant Pathosystems” v Olomouci.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Absorbance
A	Adenin
AFLP	Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
bp	Pár bází (<i>base pair</i>)
C	Cytozin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxyribonukleotidtrifosáty (stavební kameny DNA)
dATP	Deoxyriboadenozin trifosfát
dCTP	Deoxyribocytidin trifosfát
dGTP	Deoxyriboguanidin trifosfát
dTTP	Deoxyribotymidin trifosfát
EcoRI	Restrikční enzym, rozpoznává 6bp (GAATTC) dlouhou sekvenci DNA a molekulu DNA štěpí v daném místě
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová, chemický vzorec $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$
EST	Místo s expresní adresou (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
GoTaq polymeráza	Dependentní DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie <i>Thermophilus aquaticus</i>
G	Guanin
H_O	Pozorovaná heterozygotnost (<i>Heterozygosity Observed</i>)
H_E	Očekávaná heterozygotnost (<i>Heterozygosity Expected</i>)
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
MseI	Restrikční enzym, rozpoznává 4bp (TTAA) dlouhou sekvenci DNA a molekulu štěpí v daném místě
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	Náhodná amplifikovaná polymorfní DNA (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	Ribonukleová kyselina
SSR	Repetice jednoduchých sekvencí (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
T	Thymin

T_A	Teplota annealingu
TRAP	<i>Target Region Amplification Polymorphism</i>
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin, chemický vzorec (CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, chemický vzorec (HOCH ₂) ₃ CNH ₂
U	Uracil
UV	Ultrafialové záření
VNTR	Variabilní počet tandemových repeticí (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>)

9 LITERATURA

- Alexander, J. M., Poll, M., Hansjoerg, D., Edwards, P. J. (2009). Contrasting patterns of genetic variation and structure in plant invasions of mountains. *Diversity and Distributions*, 15: 502 – 512.
- Avise, J.C. (2004). *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA.
- Argyris, J., Truco, M. J., Ochoa, O., McHale, L., Dahal, P., van Deynze, A., et al. (2011). A gene encoding an abscisic acid biosynthetic enzyme (LsNCED4) collocates with the high temperature germination locus Htg6.1 in lettuce (*Lactuca* sp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 122, 95–108.
- Ayad, W. G., Hodgkin, T., Jaradat, A., Rao, V. R. (1997). *Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources*, in Report IPGRI Workshop, 9 – 11 October 1995 Rome IPGRI, Rome, Italy.
- Bartáková, V. (2013). Genetická struktura krátkověkých ryb rodu *Nothobranchius* v jižním Mosambiku. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně. 89 pp.
- Beharav, A., Ben-David, R., Doležalová, I., Lebeda A. (2008). Eco-geographical distribution of *Lactuca saligna* natural populations in Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, 56: 195 - 206.
- Beharav, A., Ben-David, R., Doležalová, I., Lebeda A. (2010a). Eco-geographical distribution of *Lactuca aculeata* natural populations in northeastern Israel. *Genetic Resources Crop Evolution*, 5: 679- 686.
- Beharav, A., Ben-David, R., Malarz, J., Stojakowska, A., Michalska, K., Doležalová, I., Lebeda, A., Kisiel, W. (2010b). Variation of sesquiterpene lactones in *Lactuca aculeata* natural populations from Israel, Jordan and Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 602 – 611.
- Beharav, A., Lewinsohn, D., Lebeda, A., Nevo, E. (2006). New wild *Lactuca* genetic resources with resistance against *Bremia lactucae*. *Genetic Resources Crop Evolution*, 53: 467 – 474.
- Beharav, A., Ochoa, O., Michelmore, R. (2014). Resistance in natural populations of three wild *Lactuca* species from Israel to highly virulent Californian isolates of *Bremia lactucae*. *Genetic Resources Crop Evolution*, 61: 603 – 609.
- Bremer, K., Anderberg, A. A., Karis, P. O., Nordenstam, B., Lundberg, J. & Ryding, O. (1994). *Asteraceae: Cladistic and classification*. Timber Press, Portland, OR.).
- Bretting, P. K., Widrechner, M. P. (1995). Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 31:11–86.
- Bryant, D., Moulton, V. (2004). Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 255–265.
- Chambers, G. K., MacAvoy, E. S. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 126: 455-476.
- Chapuis, M. P., Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.
- Chloupek, O. (1995). Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. *Academia*, 186 s.
- Cole, R. A., Sutherland, R. A., Riggall, W. E. (1991). The use of polyacrylamide gradient gel electrophoresis to identify variation in isozymes as markers for *Lactuca* species and resistance to the lettuce root aphid *Pemphigus bursarius*. *Euphytica*, 56: 237-242.
- D'Andrea, L., Felber, F., & Guadagnuolo, R. (2008). Hybridization rates between lettuce (*Lactuca sativa*) and its wild relative (*L. serriola*) under field conditions. *Environmental Biosafety Research*, 7: 61-71.

- Dakin, E. E., Avise, J. C.** (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*: 504 – 509.
- Daniels, J., Holmans, P., Williams, N., Turic, D., McGuffin, P., Plomin, R., Owen, M. J.** (1998). A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *The American Journal Human Genetics*, 62: 1189-1197.
- Doležalová, I., Křístková, E., Lebeda, A., Vinter, V.** (2002b). Description of morphological characters of wild *Lactuca* L. spp. genetic resources. *Horticultural Science*, 29: 56–83.
- Doležalová, I., Lebeda, A., Janeček, J., Číhalíková, J., Křístková, E., Vránová, O.** (2002a). Variation in chromosome numbers and nuclear DNA contents in genetic resources of *Lactuca* L. species (Asteraceae). *Genetic Resources Crop Evolution*, 49: 383-395.
- Dziechciarková, M., Lebeda, A., Doležalová, I., Astley, D.** (2004). Characterization of *Lactuca* spp. Germplasm by protein and molecular markers - a review. *Plant Soil Environment*, 50: 47 – 58.
- Dostál, J.** (1989). *Nová květena ČSSR*, 2. díl. Praha, Academia, 1112–1115.
- Dotlačil, L.** (1996). Plané druhy a krajové odrůdy - významná součást biodiverzity a genofondu zemědělských plodin. Význam planých druhů a krajových odrůd pro pěstování a šlechtění zemědělských plodin. VÚB Havlíčkův Brod. s.1- 4.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A. & Caskey, C.T.** (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American Journal of Human Genetics*, 49: 746–756.
- Ellis, J.R., Burke, J.M.** (2007). EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity* 99: 125–132.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J-M.** (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J. K.** (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574–578.
- Feráková, V.** (1977). The genus *Lactuca* L. in Europe. Bratislava, Univerzita Komenského.
- Fitch, W.** (1997). Networks and viral evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 44: S65-S75
- Globerson, D., Netzer, D., Sacks, J.** (1980). Wild lettuce as a source for improving cultivated lettuce. In: *Proceedings, Eucarpia meeting on leafy vegetables*, Littlehampton: 86-96.
- Harlan, J. R. and de Wet, J. M. J.** (1971). Towards 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 a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1202–1210.
- Hoofman, D. A. P., Flavell, A. J., Jansen, H., den Nijs, H. C. M., Syed, N. H., Sørensen, A. P., et al.** (2011). Locus-dependent selection in crop-wild hybrids of lettuce under field conditions and its implication for GM crop development. *Evolutionary Applications*, 4: 648–659.
- Hu J., Ochoa O.E., Truco M.J., Vick B.A.** (2005). Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica*, 144: 225–235.
- Hu J., Vick B.A.** (2003). Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. - *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 289–294.
- Huson, D. H., Bryant, D.** (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Molecular Biology and Evolution*, 23(2): 254–267.
- Jeffrey, C.** (1966). Notes on Compositae I. The Cichorieae in East tropical Africa. *Kew Bulletin*, 18: 427–486.

- Jeffrey, C.** (1975). *Lactuca* L. In: Davis P.H. (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edingburgh, Edingburgh University Press: 776-782
- Jeffrey, C.** (1995). Compositae systematics 1975-1993. Developments and desiderata. In: Doležalová, I., Křístková, E., Lebeda, A., Vinter, V. (2002). Description of morphological characters of wild *Lactuca* L. spp. Genetic resources (English-Czech version). Horticultural Science (PRAGUE).
- Jemelková, M., Kitner, M., Křístková, E., Beharav, A., Lebeda, A.** (in prep). Biodiversity of *L. aculeata* germplasm expressed by SSR and AFLP markers, and by resistance variation against *Bremia lactucae* (in prep).
- Jemelková, M., Kitner, M., Lebeda, A., Sahajová, E., Křístková, E., Beharav, A.** (2013). Genetic variability of *Lactuca aculeata* germplasm expressed by AFLP and SSR markers, and by resistance variation against *Bremia lactucae*. In: Lebeda, A., Burdon, J.J. (Ed.): Wild Plant Pathosystems. Programme and Proceedings of Abstracts, 1st International Conference. Czech Society for Plant Pathology and Palacký University, Olomouc (Czech Republic): 91–92.
- Jeuken, M. J. W., Pelgrom, K., Stam, P., & Lindhout, P.** (2008). Efficient QTL detection for nonhost resistance in wild lettuce: backcross inbred lines versus F2 population. Theoretical and Applied Genetics, 116: 845–857.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A.** (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding, 3: 381–390.
- Karp, A., Edwards, K. J.** (1997). DNA markers – A Global overview. In DNA Markers. Protocols, Applications and Overviews. Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P. M. (eds). J. Wiley and Sons. NY. USA: 1
- Kesseli, R.V., Michelmore, R.W.** (1986). Genetic variation and phylogenies detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. Journal of Heredity, 77: 324–331.
- 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.
- Kitner, M., Lebeda, A., Doležalova, I., Maras, M., Křístková, E., Beharav, A., Nevo, E., Pavlíček, T. & Meglic, V.** (2008). AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle East countries. Israel Journal of Plant Sciences, 56: 185–193.
- Kitner, M., Majeský, E., Křístková, E., Jemelková, M., Lebeda, A., Beharav, A.** (2014). Genetic diversity in Israeli natural populations of three predominantly self-pollinating wild *Lactuca* (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. aculeata*) species. - Genetic Resources and Crop Evolution (in press) DOI 10.1007/s10722-014-0203-5
- Koopman, W. J. M., Guetta, E., Van de Wiel, C. C. M., 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: 1517–1530.
- Koopman, W. J. M., Zevenbergen, M. J., & Van den Berg, R. G.** (2001). Species relationships in *Lactuca* spp. (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. American Journal of Botany, 88: 1881–1887.
- Kuang, H., van Eck, H. J., Sicard, D., Michelmore, R., & Nevo, E.** (2008). Evolution and genetic population structure of prickly lettuce (*Lactuca serriola*) and its RGC2 resistance gene cluster. Genetics, 178: 1547–1558.

- 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.** (1998). Biodiversity of the interactions between germplasms of wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). Report on research programme of OECD “Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems”, Horticulture Research International, Wellesbourne.
- Lebeda, A., Astley, D.** (1999). World genetic resources of *Lactuca* spp., their taxonomy and biodiversity. In: Lebeda A., Křístková E. (eds.), *Eucarpia Leafy Vegetables '99*. Olomouc, Palacký University: 81–94.
- Lebeda, A., Doležalová, I., Astley, D.** (2004). Representation of wild *Lactuca* spp. (Asteraceae, Lactuceae) in world genebank collections. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 167 – 174.
- 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*, 170: 15 – 34.
- 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., 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., Křístková, E., Dehmer, K.J., Astley, D., van de Wiel, C. C. M. & van Treuren, R.** (2007b). Acquisition and ecological characterization of *Lactuca serriola* L. germplasm collected in the Czech Republic, Germany, the Netherlands and United Kingdom. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (3): 555–562.
- Lebeda, A., Křístková, E., Kitner, M., Mieslerová, B., Jemelková, M., Pink, D. A. C.** (2014). Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. – *European Journal of Plant Pathology*, 138: 597-640.
- Lebeda, A., Pink, D.A.C., Astley, D.** (2002). Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: Spencer-Phillips, P. T. N., Gisi, U., Lebeda, A. (eds.), *Advances in Downy Mildew Research*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 85–118.
- Lebeda, A., Ryder, E. J., Grube, R., Doležalová, I., Křístková, E.** (2007a). Lettuce (*Asteraceae* *Lactuca* ssp.). In: Singh, R. J. (Ed.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vegetable Crops 3*: 77 – 472.
- Lebeda, A., Sedlářová, M., Lynn, J., & Pink, D. A. C.** (2006). Phenotypic and histological expression of different genetic backgrounds in interactions between lettuce, wild *Lactuca* spp., *L. sativa* × *L. serriola* hybrids and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 431–441.
- Lopez E. G., Jimenez A. C.** (1974). *ELENCO de la Flora Vascular Espanola (Peninsula y Baleares)*. ICONA. Madrid.
- Lu, Q. Y., Baker, J., & Preston, C.** (2007). The spread of resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides in a wind borne, self-pollinated weed species, *Lactuca serriola* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 443–450.
- McGuire, P. E., Ryder, E. J., Michelmore, R. W., Clark, R. L., Antle, R., Emery, G., Hannan, R. M., Kesseli, R. V., Kurtz, E. A., Ochoa, O., Rubatzky, V. E., Waycott, W.** (1993). Genetic resources of lettuce and *Lactuca*

species in California. An assessment of the USDA and UC collections and recommendations for long-term security. Report No. 12.

- McHale, K. L., Truco, J. M., Kozik, A., Wroblewski, T., Ochoa, E. O., Lahre, A. K., et al.** (2009). The genomic architecture of disease resistance in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 565–580.
- Meudt, M., Clarke, A. C.** (2007). Almost Forgotten or Latest Practice: AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, 12(3): 106 – 117.
- Mou, B.** (2008). Lettuce. In: Prohens, J., Nuez, F. (eds.). *Handbook of Plant Breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae*. Springer Science, New York: 75–115.
- Mullis B.** (1987). U.S. patent 4, 683, 195, July 1987 and U.S. patent 4, 683, 202, July 1987.
- Nagaoka, T., Ogihara, Y.** (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597–602.
- Nessler C.L.** (1976). A systematic survey of the tribe Cichorieae in Virginia USA. *Castanea*, 41: 226–248.
- Okubara, P. A., Arroyo-Garcia, R., Shen, K. A., Mezier, M., Meyers, B. C., Ochoa, O. E., Kim, S., Yang, Ch., Micheltore, R. W.** (1997). A transgenic mutant of *Lactuca sativa* (lettuce) with a TDNA tightly linked to loss of downy mildew resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 970 – 977.
- Ondřej, M.** (1992). *Genové inženýrství kulturních rostlin*. Academia, Praha 1992.
- Paris, M., Bonnes, B., Ficitola, G. F., Poncet, B. N., Despres, L.** (2010). Amplified fragment length homoplasy: in silico analysis for model and non-model species. *BMC Genomics*, 11: 287.
- Peakall, R., Smouse, P.E.** (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- Primmer, C. R., Moler, A. P., Ellegren, H.** (1999). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365–378.
- 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.
- Roux, L., Chengjiu, Z., Roux Y.** (1985). Characterisation of *Lactuca sativa* L. and related 93 species by electrofocusing of esterases. *Agronomie*, 5: 915–921.
- Rulkens, A. J. H.** (1987). De CGN sla-collective: inventarisatie, paspoortgegevens en enole richtlijnen voor de toekomst CGN report: CGN-T 1987-1. CGN, Wageningen.
- Russel, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W., Waugh, R.** (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 714–722.
- Řepková, J., Relichová, J.** (2001). *Genetika rostlin*. Masarykova univerzita v Brně, 269 pp.
- Salaš, P.** (2013): Modernizace výukového procesu u předmětů ovocné, okrasné školkařství a ovocnářství. Sborník přednášek z odborného semináře, Lednice na Moravě: 129–132.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
- Sicard, D., Woo, S. S., Arroyo-Garcia, R., Ocho, O., Nguyen, D., Korol, A., et al.** (1999). Molecular diversity at the major cluster of disease resistance genes in cultivated and wild *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 405–418.
- Simko, I.** (2009). Development of EST-SSR markers for the study of population structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity* 100: 256 – 262.

- Schlötterer, C.** (2004). The evolution of molecular markers – just a matter of fashion. *Natural Reviews Genetics*, 5: 63–69.
- Southern E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.
- 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.
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A.** (1966). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biology*. 31: 77–84.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.** (2005). *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 194 s. 1. vydání. ISBN 80-210-3841-1.
- Tautz, D.** (1989). Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Tautz, D., Renz, M.** (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. – *Nucleic Acids Research*, 12: 4127- 4138.
- 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.** (2007). A high-density integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 735–746.
- Uwimana, B., Smulders, M. J., Hooftman, D. A., Hartman, Y., van Tienderen, P. H., Jansen, J., et al.** (2012). Crop to wild introgression in lettuce: following the fate of crop genome segments in backcross populations. *BMC Plant Biology*, 12: 43.
- Vafková, B.** (2013). Fenotypová a fenologická variabilita populací *Lactuca aculeata*, *L. saligna* a *L. serriola* z Izraele. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- van Leeuwen, H., Stoffel, K., Kozik, A., Cui, X., Ashrafi, H., McHale, L., Lavelle, D., Wong, G., Chen, F., Truco, M. J., Van Deynze, A., & Michelmore, R. W.** (2009). Highdensity mapping of the lettuce genome with SFP markers in over 15,000 unigenes. *Plant and Animal Genome Conference XVII*, San Diego, USA.
- van Treuren, R., & van Hintum, T. J. L.** (2009). Comparison of anonymous and targeted molecular markers for the estimation of genetic diversity in ex situ conserved *Lactuca*. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 1265–1279.
- van de Wiel, C., Arens, P., & Vosman, B.** (1998). Microsatellite fingerprinting in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives. *Plant Cell Reports*, 17: 837–842.
- van de Wiel, C., Arens, P., & Vosman, B.** (1999). Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome*, 42: 139–149.
- van de Wiel, C., Sretenović-Rajičić, T., van Treuren, R., Dehmer, K. J., van der Linden, C. G., & van Hintum, T. J. L.** (2010). Distribution of genetic diversity in wild European populations of prickly lettuce (*Lactuca serriola*): implications for plant genetic resources management. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 8: 171–181.
- Vermeulen, A., Desprez, B., Lancelin, D., & Bannerot, H.** (1994). Relationships among *Cichorium* species and related genera as determined by analysis of mitochondrial RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 159–166.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23/21: 4407–4414.
- Walsh, S. P., Fildes, N. J., Reynolds, R.** (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus WA. *Nucleic Acids Research*, 24: 2807-2812.
- Waycott, W., Fort, S. B.** (1994). Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphological analyses. *Genome*, 85: 239-244.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. K., Kahl, G.** (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton: 472.
- Williams, G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. L., Rafalski, J. A., Tingey, S. V.** (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Witsenboer, H., Michelmore, R. W., & Vogel, J.** (1997). Identification, genetic localization and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome*, 40: 923–936.
- Yang, T. J., Jang, S. W., & Kim, W. B.** (2007). Genetic relationships of *Lactuca* spp. revealed by RAPD, Inter-SSR, AFLP, and PCR-RFLP analyses. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 10: 29–34.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T.** (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zohary D.** (1991). The wild genetic resources of cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica*, 53: 31-35.

10 PŘÍLOHY

Příloha 1

Jemelková, M., Kitner, M., Lebeda, A., Sahajová, E., Křístková, E., Beharav, A. (2013). Genetic variability of *Lactuca aculeata* germplasm expressed by AFLP and SSR markers, and by resistance variation against *Bremia lactucae*. In: Lebeda, A., Burdon, J.J. (Ed.): Wild Plant Pathosystems. Programme and Proceedings of Abstracts, 1st International Conference. Czech Society for Plant Pathology and Palacký University, Olomouc (Czech Republic), pp. 91–92.

Genetic variability of *Lactuca aculeata* germplasm expressed by AFLP and SSR markers, and by resistance variation against *Bremia lactucae*

M. Jemelková¹, M. Kitner¹, A. Lebeda¹, E. Sahajová¹, E. Křístková¹, A. Beharav²

¹ Palacký University: Department of Botany, Olomouc, Czech Republic
(*e-mail: ales.lebeda@upol.cz)

² Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel

The wild lettuce, *Lactuca aculeata* Boiss, is a robust and very prickly annual plant which is closely related and fully interfertile with cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.) and *L. serriola* L. (Lebeda et al. 2012). This species is distributed in a relatively limited geographical area of Near East and the Anatolian plateau (Lebeda et al. 2004). Preliminary studies showed that *L. aculeata* is rather homogenous species from the viewpoint of morphology and isozyme polymorphism (Lebeda et al. 2012). The recent study is focused on molecular polymorphism and resistance to *Bremia lactucae*, i.e. two not known features of *L. aculeata* variation.

In total, seventy six *L. aculeata* accessions (accs.) originating from natural populations in Israel, Turkey and Jordan (Beharav et al. 2010) were analysed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and simple sequence repeats (SSRs). Furthermore, the morphological observation and screening for lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) resistance have been performed.

Finally, 287 AFLP and 8 microsatellite markers were analysed using classical „tree-based“ and Bayesian clustering methods confirming morphological re-determination of four *L. serriola* and three hybrid accessions. Molecular data reflect the geographical origin of samples, which grouped according to the country of their origin. Similar genetic characters were observed among accessions from neighboring parts of Jordan and Israel where migration or artificial introduction of plant material is more possible.

Fourty-one *Lactuca aculeata* accessions (from the same trial) were tested for the resistance against *Bremia lactucae*. Altogether 5 isolates (BI races – BI 17, BI 18, BI 24, BI 27 and BI 28) were used for resistance screening. In the studied set of *L. aculeata* accessions was found frequent occurrence of race-specific reaction patterns. These patterns are showing that in *L. aculeata* could be expected different race-specific resistance factors/genes. However, susceptible reactions were prevailing what is showing that this species cannot be considered as a very useful source of resistance for lettuce breeding. As the most virulent races were recorded BI 18, BI 24, BI 27 and BI 28, in opposite the race BI 17 was less virulent.

References

- Beharav, A., Ben-David, R., Doležalová, I., Lebeda, A. (2010). Eco-geographical distribution of *Lactuca aculeata* natural populations in northeastern Israel. Genetic Resources and Crop Evolution, 57, 679-686.
- Lebeda A., Doležalová I., Ferřková V., Astley D (2004). Geographical distribution of wild *Lactuca* spp. (Asteraceae, Lactuceae). The Botanical Review, 70: 328–356
- 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.

Acknowledgements

The research was supported by grant MSM 6198959215 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic) and by the internal grant of Palacký University in Olomouc (IGA_PPF_2013_001).



Genetic variability of *Lactuca aculeata* germplasm expressed by AFLP and SSR markers, and by resistance variation against *Bremia lactucae*

Michaela Jemelková¹, Miloslav Kitner¹, Aleš Lebeda¹, Eliška Sahajová¹, Eva Krístková¹, Alex Beharav²

¹ Palacký University, Department of Botany, Olomouc, the Czech Republic (*e-mail: ales.lebeda@upol.cz)
² Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel

Wild Plant Pathosystems, Olomouc 2013

Introduction

The wild lettuce, *Lactuca aculeata* Boiss, is a robust and very prickly annual plant which is closely related and fully interfertile with cultivated lettuce (*L. sativa* L.) and *L. serriola* L. (Lebeda et al. 2012). This species is distributed in a relatively limited geographical area of Near East and the Anatolian plateau (Lebeda et al. 2004). Preliminary studies showed that *L. aculeata* is rather homogenous species from the viewpoint of morphology and isozyme polymorphism (Lebeda et al. 2012). The recent study is focused on molecular polymorphism and resistance to *Bremia lactucae*, i.e. two not known features of *L. aculeata* variation.

Material and Methods

In total, seventy six *L. aculeata* accessions originating from natural populations in Israel, Turkey and Jordan (Beharav et al. 2010) were analysed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and 8 microsatellite markers (SSRs) (Simko 2009, Riar et al. 2011). Furthermore, the morphological observation and screening for lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) resistance have been performed.

Results and Discussion

Molecular data

Using 287 AFLP and 8 microsatellite markers we were able to confirm morphological re-determination of three *L. serriola* and six hybrid accessions (*L. serriola* x *L. aculeata*).

Furthermore the visualisation of differences between and among samples using Bayesian analysis (Falush et al. 2007, Fig. 1) and NeighborNetwork (Huson, Bryant 2006, Fig. 2) reflect the geographical origin of the samples, grouped according to the country of their origin. Similar genetic characters were observed among accessions from neighboring parts of Jordan and Israel where migration or artificial introduction of plant material is more possible. Moreover, slightly different character of *L. aculeata* from Turkey was observed as well.

Very interesting is the detection of certain proportion of *L. serriola*-like genotype in a part of both Jordan and Israel *L. aculeata* accessions. We were able to detect three additional accessions exhibiting hybrid character using molecular markers, which were not considered as accessions with hybrid character by standard morphological characterisation. This indicates ongoing interspecific hybridisation in natural populations of *L. serriola* and *L. aculeata*.

Comparing the results acquired by two different molecular markers - the AFLP's were able to provide more robust description of the genetic structure of analysed samples compared to SSR's.

Phytopathological data

A subset of 41 *L. aculeata* accessions originating from Turkey (TUR), Jordan (JOR) and Israel (ISR) was tested for the resistance against *B. lactucae*.

Altogether 5 isolates (BI races BI 17, BI 18, BI 24, BI 27 and BI 28) were used for seedling test (Lebeda & Petřelová, 2010). In the studied set of *L. aculeata* accessions six of race-specific reaction patterns were found (pattern 1 to 6), including full susceptibility (Table 1). The highest variability of reactions was observed in populations from Israel (six patterns), the lowest in Turkey (one pattern).

Susceptible reactions were prevailing, however, surprisingly there was recorded also full resistance what is showing that this species could be considered as interesting source of new race-specific resistance for lettuce breeding against *B. lactucae*.

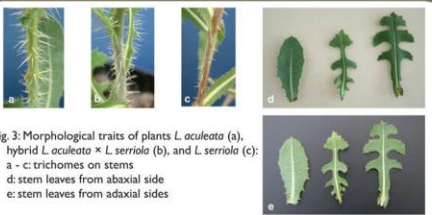


Fig. 3: Morphological traits of plants *L. aculeata* (a), hybrid *L. aculeata* x *L. serriola* (b), and *L. serriola* (c): a - c: trichomes on stems; d: stem leaves from abaxial side; e: stem leaves from adaxial sides

Pattern no.	BL 17	BL 18	BL 24	BL 27	BL 28	TUR*	JOR*	ISR*
1	+	+	+	+	+	5	2	6
2	-	+	+	+	+		10	9
3	-	-	+	+	+			1
4	-	+	+	+	-		1	1
5	-	-	-	+	-			4
6	-	-	-	-	-			2

+ ... susceptibility; - ... resistance N = 41

Table 1. Response of *Lactuca aculeata* accessions to *Bremia lactucae* races, with records of reaction patterns per individual population.

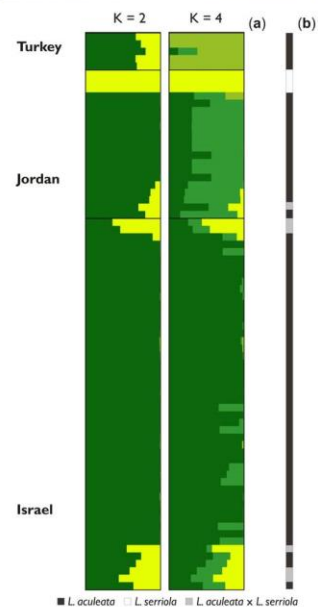


Fig. 1: Results of (A) Bayesian clustering and of AFLP and SSR data (a) and morphological determination (b) of 75 *Lactuca* spp. accessions.

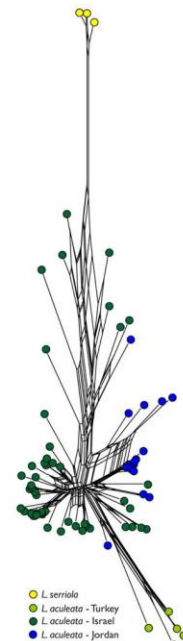


Fig. 2: NeighborNetwork based on joined AFLP and SSR analysis

Take-home message

- Similar genetic background of accessions from Israel and Jordan was observed, which were different from accessions from Turkey.
- Interspecific hybrids of *L. aculeata* and *L. serriola* can be frequently present in natural populations in Near Eastern countries.
- Interaction of *L. aculeata* with *B. lactucae* is race specific.
- In studied set of *L. aculeata* genotypes we did not find suitable sources for lettuce resistance breeding

Acknowledgement

The research was supported by grant MSM 6198959215 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic) and by the internal grant of Palacký University in Olomouc (IGA_Prf_2013_001).

References

- Beharav A., Ben-David R., Doležalová I., Lebeda A. (2010). Genet. Resour. Crop Ev. 5: 679-686.
 Huson D.H., Bryant D. (2006). Mol. Biol. Evol. 23: 254-267.
 Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. (2007). Mol. Ecol. Notes 7: 574-578.
 Riar D.S., Rustgi S., Burke I.C., Gill K.S., Yenish J.P. (2011). J. Hered. 102: 17-28.
 Simko I. (2009). J. Hered. 100: 256-262.
 Lebeda A., Doležalová I., Feršková V., Astley D. (2004). Bot. Rev. 70: 328-356.
 Lebeda A., Kitner M., Křístková E., Doležalová I., Beharav A. (2012). Biochem. System. Ecol. 42: 113-123.
 Lebeda A., Petřelová I. (2010). In: Spencer M.M. & Lebeda A. (Eds.), Mini Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases. IAEA, Vienna, Austria.