

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Testování mikrosatelitních markerů pro
lakušník nit'olistý (*Ranunculus trichophyllus*)**

Bakalářská práce

Jakub Kořenář

Školitel: Mgr. Petr Koutecký, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Jiří Košnar, Ph.D.

České Budějovice 2022

Kořenář J., 2022: Testování mikrosatelitních markerů pro lakušník niťolistý (*Ranunculus trichophyllus*). [Testing of microsatellite markers for *Ranunculus trichophyllus*. Bc. Thesis, In Czech]. – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Clonality is a very common type of reproduction in aquatic plants. Microsatellite markers are suitable for the identification of individuals, and also for population genetics. Since microsatellite loci for European *Ranunculus* sect. *Batrachium* are not known, this work has focused on identifying and optimizing ones. PCR and fragment analysis were performed on different *Ranunculus* species and putative microsatellite loci to test their amplification and variability.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 12. 4. 2022

.....

Jakub Kořenář

Poděkování

Srdečně bych rád poděkoval vedoucímu své práce Petru „Kout'ovi“ Kouteckému, který, i přes neustálé vysvětlování mi dokola toho samého, neztrácel nervy, a i po sté mi vše vysvětlil znovu bez viditelných známek rozčilení. Petrovi, Bety Manukjanové a samozřejmě Jirkovi Košnarovi velice děkuji za udržování přátelského prostředí v laboratoři, kde mi dali praktický základ laboratorní práce do budoucích let.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled	3
2.1	Mikrosatelity.....	3
2.2	Lakušníky.....	4
2.3	Využití mikrosatelitů u rostlin	7
3	Metodika	10
3.1	Materiál.....	10
3.2	Izolace DNA	14
3.2.1	CTAB	14
3.2.2	NaOH	15
3.3	Primery.....	15
3.4	PCR.....	19
3.5	PCR s M13 primery	19
3.6	Gelová elektroforéza.....	21
3.7	Sekvenační analýza.....	22
3.8	Fragmentační analýza	23
4	Výsledky	24
5	Diskuze	28
6	Závěr.....	30

1 Úvod

Mikrosatelit, jinak označovaný také zkratkou SSR z anglického *short-sequence repeat*, je genetický pojem, který představuje opakující se určitou sekvenci DNA. Jedná se o krátký sekvenční motiv o délce 1-6 bází, které se několikrát až mnohokrát opakuje. Mikrosatelity se vyskytují jak v eukaryotní, tak v prokaryotní DNA, a jsou k nalezení jak v kódujících, tak i v nekódujících oblastech (Remya et al. 2010). Evolučně jsou významné kvůli jejich nestabilitě, mutují rychlostí mezi 10^{-3} a 10^{-6} na buněčnou generaci, tj. až $10\times$ rychleji než bodové mutace (Vieira et al. 2016). Tento článek také uvádí, že se vyskytují především v nekódujících oblastech, zatímco četnost výskytu mikrosatelitů v kódujících oblastech je nižší. Jejich časté mutace, které spočívají v přidání nebo ubrání repetitivního motivu, by mohly ohrozit genovou expresi, protože mohou změnit čtecí rámeček. Studie ukazují, že v kódujících oblastech je právě proto převaha repetitivních s motivy tri- a hexanukleotidového typu, což je výsledek selekčního tlaku proti takovým mutacím (Vieira et al. 2016).

I přes to, že mikrosatelity byly objeveny již v 80. letech minulého století, stále se o jejich významu ví málo, a to především u rostlin (Vieira et al. 2016). V posledních letech se staly nejrozšířenějšími markery pro genotypizaci rostlin, protože se jedná o vysoce informativní, kodominantní, multialelové genetické markery, které jsou experimentálně reprodukovatelné a přenositelné mezi blízkými příbuznými druhy (Mason 2015). Používají se například v evolučních studiích, především v populační genetice (Vieira et al. 2016). Dále se používají například při konstrukci genetických map (Oliveira et al. 2006) nebo ke rozlišení morfologicky podobných organismů (Trivedi 2004).

Když půjdete přírodou a uvidíte kvetoucí rybník plný lakušníků, tak jako na *Obrázku 1*, lze jen těžko určit, zda se jedná o jednoho jedince, který se rozmnožil vegetativně (tj. klon) nebo zda se jedná o potomky dvou rodičů nebo zda část potomstva vznikla samooplozením. K tomuto rozlišení by bylo zapotřebí znát genetickou variabilitu populace, a právě mikrosatelitní sekvence jsou jedním z nejvhodnějších markerů. Bohužel obecně o lakušnicích se toho v tomto směru moc neví. V roce 2017 vyšel článek v časopisu *Applications in Plant Sciences* o vývoji mikrosatelitních markerů odvozených z asijského druhu *Ranunculus bungei* (Wu et al. 2017). Na základě tohoto článku byla zadána bakalářská práce (Gemeinhardt 2019), ve které byla testována tzv. „*cross-species*“ amplifikace lokusů vyvinutých pro *R. bungei* na středoevropských lakušnicích. PCR ve většině případů proběhla úspěšně,

ale při sekvenování měly evropské lakušníky kratší motivy opakování a často se také vyskytly mikrosatelitní sekvence přerušené jedním či více bázemi. Krátké nebo přerušené mikrosatelitní sekvence nemutují vůbec anebo mutují moc pomalu na to, aby se v nich vytvořila variabilita. Mezi jednotlivými druhy byly obvykle rozdíly, ale uvnitř druhů (tj. mezi populacemi a jedinci) většinou ne, tj. pro daný lokus byla přítomná jediná alela. Z těchto důvodů bohužel nelze tyto mikrosatelitní lokusy použít pro populační genetiku evropských lakušníků, mohou být užitečné pouze pro identifikaci druhů. Důvodem, proč lokusy vyvinuté pro *R. bungei* nefungovaly na středoevropské lakušníky, může být přílišná fylogenetická odlišnost. Z toho vyplývá, že různé druhy měly dostatek času na vznik nových mutací v různých částech DNA, každý druh se mohl vyvíjet jiným směrem, a mikrosatelitní markery nejsou mezi druhy přenositelné. Proto by bylo vhodné zkusit najít vhodné lokusy a otestovat primery i na středoevropské lakušníky. I u těch se předpokládají rozdíly, tudíž je potřeba testovat mikrosatelitní markery pro každý druh zvlášť. Tato práce se zabývá konkrétně testováním pro druh *R. trichophyllus* (cytotypy A a B, viz dále).



Obrázek 1: Rybník posetý květy *R. peltatus* (zdroj: Petr Koutecký).

2 Literární přehled

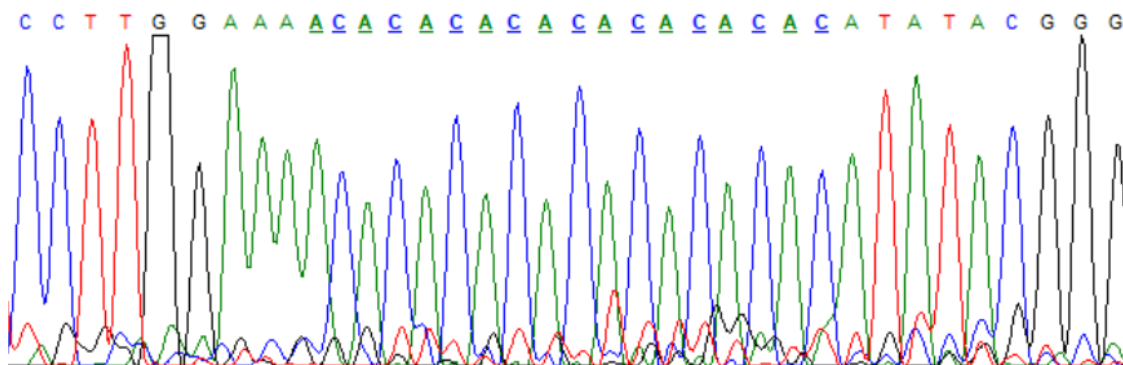
2.1 Mikrosatelity

Jak již bylo řečeno, změny v mikrosatelitní sekvenci obvykle vznikají přidáním nebo odstraněním celých repetitivních motivů a tyto mutace jsou poměrně časté. Proto různí jedinci stejného druhu mohou vykazovat rozdíly právě v počtu opakování repetice. Tyto rozdíly vznikají hlavně skluzem polymerázy při DNA replikaci anebo chybami při rekombinaci. Skluz polymerázy může vznikat například tím, že se při replikaci na templátovém vlákne vytvoří smyčka a nově vzniklé vlákno se spolu s templátovým neshodují. To vede k rekombinačním změnám, které mohou kvůli smyčce mikrosatelit prodloužit anebo zkrátit. Podle některých autorů platí, že čím delší repetice je, tím je vyšší frekvence vzniku mutace. Mutace, které se vyhnuly opravám chybného párování DNA, tvoří nové alely v mikrosatelitních lokusech. Z tohoto důvodu mohou na daném lokusu existovat různé alely, což znamená, že jsou mikrosatelity často informativnější než jiné molekulární markery, včetně jednonukleotidových polymorfismů, které mutují pomaleji nebo mají menší počet alel (Vieira et al. 2016).

Mikrosatelity jsou různě klasifikovány v závislosti na jejich velikosti, typu opakování nebo na jejich umístění v genomu. Podle velikosti byly rozděleny na základě počtu nukleotidů v opakování na mononukleotidy, př. $(A)_n$, dinukleotidy, př. $(CA)_n$, trinukleotidy, př. $(CGT)_n$, tetranukleotidy, př. $(CAGT)_n$, pentanukleotidy, př. $(CAGTA)_n$ a na hexanukleotidy, př. $(CAGTAG)_n$, kde n značí počet opakování (Kalia et al. 2011). U rostlin se nejčastěji objevují dinukleotidová opakování AC/AG/AT, trinukleotidová s motivem AAT (Srivastava et al. 2019) a podle (Kalia et al. 2011) je nejčastějším motivem AAG. Na *Obrázku 2* je podtrženě vyznačena mikrosatelitní sekvence s motivem opakování AC.

Dále se mikrosatelity rozdělují podle typu opakování na dokonalé, nedokonalé, složené nebo přerušované (Bhargava & Fuentes 2010). Dokonalá mikrosatelitní sekvence není narušena žádnou jinou bází, může vypadat např. takto (TATATATATATATA). Opakem je sekvence nedokonalá, kde se v sekvenci nachází několik bází nepatřících do opakuujícího se motivu, např. (TATATATACTATATA). Jako přerušovaná sekvence je označována taková sekvence, ve které se nachází jiná krátká sekvence nesouvisející s opakuujícím se motivem, např. (TATATACCGTGTTATATATA). Složený mikrosatelit je takový, který se skládá ze dvou sousedních sekvencí, př. (TATATATATAGTGTGTGTGT) (Oliveira et al. 2006).

Dalším pojmem souvisejícím s mikrosatelity je tzv. „*flanking sequence*“, což jsou sekvence obklopující mikrosatelit. Je to část nekódující a nerepetitivní sekvence DNA, která může hrát významnou roli v případě, kdy jsou tyto *flanking* regiony sdílené napříč druhy. Právě do těchto regionů jsou navrhovány primery pro PCR amplifikaci mikrosatelitního lokusu. Pro výzkum druhů, ke kterým nebyly publikovány žádné mikrosatelity, lze použít metodu mezidruhovú mikrosatelitní amplifikace s použitím již známých sekvencí od příbuzných druhů (Ebrahimi et al. 2019).



Obrázek 2: Mikrosatelitní sekvence se vzorem opakování AC.

2.2 Lakušníky

Ranunculus sect. *Batrachium*, dříve v části literatury samostatný rod *Batrachium*, jehož oddělování je podle nedávných molekulárně fylogenetických dat neopodstatněné, česky lakušníky, patří mezi taxonomicky jednu z nejsložitějších skupin vodních rostlin. Je to způsobeno jejich morfologickou redukcí a fenotypovou plasticitou, stejně jako častým výskytem polyploidie a hybridizace, které vedou k četným morfologicky nedetekovatelným nebo obtížně detekovatelným taxonům (Prančl et al. 2018). Dnes je celosvětově rozlišováno celkem 30 druhů (Wiegler et al. 2017) z nichž se s osmi můžeme setkat na území ČR, a to konkrétně s *Ranunculus aquatilis*, *R. baudotii*, *R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*, *R. penicillatus*, *R. rionii* a *R. trichophyllus* (Prančl 2015).

Morfologickou zvláštností je heterofylie, která však nemusí být nalezena u všech jedinců. Prvním typem listů jsou listy niťovité, které jsou primárně ponořené. Právě niťovité členění jim pomáhá efektivně využívat kyslík a světlo pod vodou. Druhým typem jsou listy lupenité, které nejčastěji plavou na vodní hladině. Existují však i druhy, které jeden z typů listů postrádají. Příkladem je *R. trichophyllus*, česky lakušník niťolistý, na který je zaměřena tato práce, postrádající listy lupenité. Květy se vyskytují nad vodní hladinou, jsou bílé

a výrazné, druh od druhu se liší jejich velikostí, na *Obrázku 3* vidíme velké květy *R. peltatus*. Velikost květů jasně souvisí s životní rozmnožovací strategií. Setkáme se zde jak se samosprašností, tak s cizosprašností. Zvláštností u samosprašnosti je samoopylení ještě v poupěti pod vodou, takové rostliny někdy kvetou i pod vodou a květy nad vodní hladinou vůbec nemusí vytvářet. Semeny se nejčastěji rozmnožují taxony žijící ve stojatých vodách, v tekoucích vodách pomocí fragmentů lodyh (Prančl 2015).

Jako jiné vodní rostliny byly lakušníky nalezené v přírodních stanovištích brány jako vzácné kvůli nedostatku přirozených biotopů. Většina z nich potřebuje stojaté až mírně tekoucí čisté vody, preferují mělká místa s kolísající vodní hladinou a s dostatkem světla (Englmaier 2016).

Jak již bylo zmíněno výše, u lakušníků se často setkáváme s polyploidii. Celkem jsou známé formy pohybující se od diploidie až po hexaploidii (Prančl et al. 2018). Některé druhy zahrnují dokonce více forem s ohledem na velikost genomu. Krásným příkladem je druh použit v této práci – *Ranunculus trichophyllus*, který se rozděluje na dvě formy (cytotypy) *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B (Prančl et al. 2018).

Ranunculus trichophyllus tedy patří mezi osm druhů, které lze najít na území ČR. Jedná se o vytrvalou rostlinu, vzácně jednoletou. Jak již bylo řečeno, u tohoto druhu se vyskytují pouze niťovité listy dosahující délky až 50 mm, které jsou bohatě větvené. Od ostatních druhů se výrazně liší velikostí květů, květy dosahují velikosti až 15 mm v průměru (u ostatních druhů mohou dosahovat délky 20–40 mm v průměru). Květy, a i celou rostlinu, lze vidět na *Obrázku 3* a *4*. Korunní lístky mají bílou barvu s nažloutlou skvrnu na bázi, ve které je nektarium. Ve stojatých vodách bývají květy více otevřené a cizosprašné, naopak v tekoucích vodách ne zcela otevřené a spíše samosprašné. U *R. trichophyllus* je uváděn diploidní, tetraploidní a hexaploidní cytotyp (Englmaier 2016), ovšem jiné zdroje přisuzují hexaploidii jako důsledek hybridizace (Wiegleb et al. 2017). Vyskytuje se především v tekoucích, ale také ve stojatých, čistých vodách, na štěrkovitých až bahnitých substrátech od hor do nížin. Je mírně tolerantní ke zvýšeným obsahům minerálních živin, ale občas se vyskytuje i ve vodách na silikátových podložích (Englmaier 2016).

Zmíněno již bylo i rozdělení *R. trichophyllus* ve střední Evropě na dva cytotypy A a B. Oba jsou tetraploidní, ale cytotyp B je morfologicky o něco mohutnější, větší má i genom. V průměru se ve velikosti genomu liší o 11 % (Prančl et al. 2018). Odděluje je od sebe i rozdíl v ITS sekvenci a mírně se liší v plastidové DNA. Obývají různá stanoviště, A obývá nevápnité a B vápnité vody, a mají odlišné geografické rozšíření. Během porovnávání ITS sekvencí byla objevena značná podobnost mezi *R. trichophyllus* B a *R. aquatilis*, kteří vykazují i morfologickou podobnost. *R. trichophyllus* B je zřejmě předkem *R. aquatilis* (Koutecký et al. 2022).



Obrázek 3: Kvetoucí *R. peltatus* (zdroj: Petr Koutecký).



Obrázek 4: *Ranunculus trichophyllus* (cytotyp B)(zdroj: Petr Koutecký).

2.3 Využití mikrosatelitů u rostlin

Jak již bylo zmíněno výše, mikrosatelity se hojně používají v populační genetice. Níže jsou popsány konkrétní příklady využití mikrosatelitů u rostlin suchozemských a především vodních. Problematika studovaná v těchto pracích spočívala v těchto tématech: (a) odlišení klonálního a pohlavního rozmnožování, (b) zjištění mezipopulačních vztahů a analýza toku genů, (c) rozlišení morfologicky podobných druhů a (d) analýza míry hybridizace.

Jedním z využití mikrosatelitů je rozlišení vegetativních klonů od jedinců vzniklých pohlavním rozmnožováním. Příkladem jsou studie mořských rostlin, které mohou tvořit i několik set let staré obrovské podvodní „louky“ nebo „pralesy“. Populace *Thalassia testudinum* (čeleď Hydrocharitaceae) v ústí řeky Indiana na Floridě je dlouhá až 47 kilometrů. Celkem osm lokalit po celé délce 47 km dalo dohromady 382 vzorků. Genetická analýza vycházela z předchozího vývoje mikrosatelitních markerů vyvinutých Van Dijkem (2007). Výsledky nakonec ukázaly, že 89 % ze všech vzorků sdílely jediný multilokusový genotyp. Další statistické údaje potvrdily, že se jedná opravdu o klony (Bricker et al. 2018).

Jiný typ práce se zabýval hybridizací, která ohrožuje už tak mizející *Nuphar pumila* (stulík malý, Nymphaeaceae), reliktní druhu s několika izolovanými populacemi v Alpách (kde studie probíhala, druh se ale vyskytuje i jinde). Šlo o molekulární potvrzení, zda mezi druhem *N. pumila*, vyskytujícím se ve vysokohorských jezerech, a *N. lutea* (stulík žlutý), vyskytujícím se spíše nížinách, dochází k hybridizaci a v jaké míře. Z celkem 13 populací *N. pumila* bylo získáno 194 vzorků, celkem 20 vzorků bylo získáno ze dvou přírodních populací *N. lutea* a z jedné populace z botanické zahrady. Následně bylo vytvořeno 8 fluorescenčně značených mikrosatelitních primerů k multilokusové analýze. Následně byla porovnávána míra hybridizace. Výsledky potvrdily obávané – více než 40 % zkoumaných jedinců *N. pumila* mělo genetickou příměs, a ve více než 60 % všech populací byli nalezeni hybridní jedinci. Dochází i k introgresi, jelikož se pozorovaní hybridní jedinci zpětně kříží se svými rodičovskými druhy. Z toho vyplývá, že se rozšiřující *N. lutea* stane konkurentem *N. pumila*, a ten bude nakonec vyřazen kvůli tzv. „genetic swamping“, což znamená nahrazení původních genotypů hybridy. Z tohoto důvodu klade výzkumná skupina důraz na místní správu, která by podle nich měla zahájit pravidelný monitoring a přísně zakázat jakékoli vysazování *N. lutea* v blízkosti čistých populací *N. pumila* (Arrigo et al. 2016).

U čínského vysokohorského lakušníku *Ranunculus subrigidus* byla pomocí mikrosatelitních markerů zkoumána genetická diverzita 13 populací rozmístěných po Tibetské náhorní plošině s cílem objasnit relativní vliv geografické vzdálenosti a rozdílnosti prostředí na prostorovou genetickou strukturu. Celkem bylo sesbíráno 228 jedinců z 13 populací, přičemž počet sebraných vzorků z jedné populace se pohyboval od 13 do 22 vzorků. Ze sesbíraných vzorků bylo navrženo a vytvořeno celkem 13 mikrosatelitních primerů, dále byly použity 4 primery z práce Wu et al. (2017) vyvíjené na *R. bungei*. Výsledky ukázaly nízkou úroveň genetické diverzity v rámci populací. Následné analýzy prokázaly významný vliv prostředí na genetickou divergenci druhu (mezi populacemi). Ke genetické heterogenitě populací *R. subrigidus* přispívají jak klimatické faktory, tak faktory týkající se kvality vody (Wu et al. 2019).

Ottelia ulvifolia (Hydrocharitaceae) je sladkovodní rostlina, která díky extrémně variabilní morfologii a přítomnosti kryptické diverzity činí svou klasifikaci problematickou. Kryptické druhy byly potvrzeny analýzou asijských rostlin. Vědci zabývající se touto problematikou se rozhodli prozkoumat další populace rodu *Ottelia*, tentokrát v Africe, která je považována za centrum diverzity tohoto rodu. Vzorky byly sbírány celkem ze 17 populací druhu *O. ulvifolia*. Z transkriptomů *O. ulvifolia* bylo identifikováno celkem 6 variabilních mikrosatelitních lokusů. Kromě mikrosatelitů byly analyzovány i sekvence jaderné (ITS) a chloroplastové DNA. Celkem bylo zanalyzováno 135 vzorků *O. ulvifolia*, které ukázaly větší variabilitu v rámci populace než variabilitu mezi populacemi, ale i rozdíly mezi populacemi byly významné. Další analýza ukázala přítomnost tří druhů v rámci komplexu *O. ulvifolia*, kde v jedné skupině z těchto tří druhů byly zastoupeny dva kryptické poddruhy, které ale nevykazovaly žádné morfologické rozdílnosti. Nedostatek morfologických odlišností zapříčiňuje asi jejich nedávná divergence, kde za krátký čas nebyly schopny získat žádnou morfologickou změnu. Nicméně mikrosatelitní markery však vykazují relativně vyšší variabilitu ve srovnání se studovanými sekvencemi, a proto by mohly být tyto dva morfotypy adekvátně vymezeny. Autoři píší, že se budoucí studie budou zabývat účinnějšími metodami, jako např. analýzou kompletního chloroplastového genomu nebo restriktivně asociovanou DNA (RADseq), které by mohly poskytnout komplexnější poznání tohoto složitěho taxonu (Li et al. 2020).

Jinde byly mikrosatelity využity k analýze genetické struktury populace, toku genů a úrovní inbreedingu. To bylo zkoumáno např. na rostlině *Arnica montana* (prha arnika, Asteraceae), u které bylo pozorováno zmenšování populací v nižších nadmořských výškách. Vzorky byly nasbírány celkem na pěti geograficky různých oblastech sahajících od nížin až po středohoří. Čtyři stanoviště se nacházela v Německu, jedno v Itálii. Analýza byla provedena hlavně pro získání poznatků pro efektivní ochranu právě ubývajících populací. Pro tvorbu mikrosatelitních markerů byla nejdříve vytvořena obohacená knihovna fragmentů, která nakonec obsahovala celkem 676 sekvencí, z toho podle 361 sekvencí byly vytvořeny primery. Nakonec bylo vybráno 24 lokusů na screening, z toho po fragmentační analýze zbylo 14 polymorfických lokusů. (Duwe et al. 2015). V navazující studii zkoumající středoevropskou diverzitu populací v závislosti na nadmořské výšce bylo nasbíráno celkem 561 vzorků na 30 lokalitách napříč Německem a Alpami. Z 561 vzorků vykazovalo 63 jedinců identické multilokusové genotypy, a proto byly identifikovány jako klony a také vyřazeny z analýzy. Po vyloučení klonů zbylo 460 jedinců z 24 lokalit. Dále byla analyzována mezipopulační variabilita, která ukázala vysokou diferenciaci i mezi populacemi geograficky blízkými. Obecně se ukázalo, že silná genetická diferenciaci *A. montana* naznačuje omezený tok genů mezi populacemi z důvodů prostorové izolace. Mimo jiné bylo zjištěno, že populace z nižších nadmořských výšek vykazují častější tendence ke klonálnímu rozmnožování. Výsledky naznačují, že zejména populace v nížinách budou záviset na lidském zásahu, jako je asistovaný tok genů a posílení populace, aby se zabránilo další genetické erozi (Duwe et al. 2017).

3 Metodika

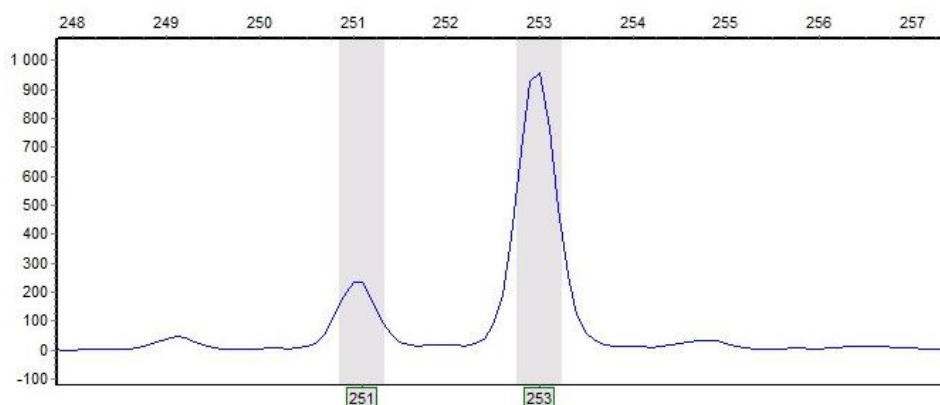
3.1 Materiál

Všechny rostliny, které byly použity v mé práci, byly nasbírány ještě před začátkem práce, tudíž jsem se na jejich sběru nepodílel. Byly mi poskytnuty vzorky z herbářů, listy fixované vysušením v silikagelu a uchovávané v mrazicích boxech nebo již rovnou hotové izoláty.

Vzorky lze rozdělit do tří skupin. První skupina obsahuje 16 vzorků různých taxonů z různých středoevropských lokalit, na kterých byla zkoušena PCR. Seznam vzorků je uveden v *Tabulce 1*.

Druhá skupina obsahuje 8 vzorků taktéž z různých lokalit, ale již se jedná pouze o *R. trichophyllus* A a *R. trichophyllus* B. Na této skupině byla zkoušena metoda PCR s M13 primerem a fragmentační analýza pro lokusy, u kterých základní PCR proběhla úspěšně. To znamená, že se při zobrazení na gelu objevil jasný proužek, který udává úspěšnost amplifikace. Seznam vzorků je uveden v *Tabulce 2*.

Třetí skupina se skládá z 16 vzorků *R. trichophyllus* A a z 16 vzorků *R. trichophyllus* B. U obou taxonů bylo vybráno několik populací a 2–4 každé z jedné populace. Na této skupině byla taktéž zkoušena metoda PCR s M13 primerem a fragmentační analýza u lokusů, které vykazovaly nadějně výsledky v předešlém kroku (dobře čitelné a interpretovatelné výsledky fragmentační analýzy, viz *Obrázek 5*). Seznam vzorků je uveden v *Tabulce 3*. U těchto vzorků byla znovu testována čitelnost výsledků fragmentační analýzy a byla sledována variabilita uvnitř populací i mezi populacemi. Lokusy, které vykazují dostatečnou variabilitu, mohou být použity pro další populačně genetické analýzy.



Obrázek 5: Čitelný výsledek fragmentační analýzy (pík velikosti 251 představuje tzv. „stutter peak“, píky 253 zobrazuje velikost konkrétní alely).

Tabulka 1: Seznam vzorků pro PCR testy; sloupec Kód odpovídá seznamu lokalit v publikacích Prančl et al. (2018) a Koutecký et al. (2022), kde jsou uvedeny podrobnosti, pro lokality tam neuvedené jsou za *Tabulkou 3*; poslední číslice ve sloupci Kód je číslo jedince; sloupec Číslo je pracovní číslo izolátu používané v laboratoři; ve sloupci Izolace DNA je uvedena použitá metoda, pro vzorky, u kterých jsem měl již k dispozici hotové izoláty, je toto pole prázdné.

Taxon	Populace	Kód	Číslo	Izolace DNA
aquatilis	CZ, Blansko, řeka Svitava	K18-35-2	816	CTAB
aquatilis	AT, Marchegg, potok	K17-15-1	817	CTAB
baudotii	AT, Angern an der March, písčokovna	K17-11-2	812	CTAB
baudotii	HU, Sarród, písčokovna	HU-02-1	820	CTAB
circinatus	PL, Sandomierz, slepé rameno řeky	K18-10-1	808	CTAB
fluitans 2x	CZ, Senorady, řeka Jihlava	K13-27-3	811	CTAB
fluitans 2x	HU, Mescér, řeka Mosoni-Duna	HU-01-1	819	CTAB
peltatus	CZ, Nová Včelnice, ryb. Velká Peruť	K19-19-1	810	CTAB
peltatus	AT, Rudmanns, rybník	K17-30-1	818	CTAB
rionii	HU, Szeksárd, písčokovna	K19-05-1	809	CTAB
trichophyllus A	CZ, Lipí, ryb. Haberský Mlýnský	K18-43-1	814	CTAB
trichophyllus A	CZ, Krnov–Chomýž, rybník	K13-10-3	822	CTAB
trichophyllus B	AT, Goggendorf, řeka Schmida	K18-47-1	815	CTAB
trichophyllus B	AT, Marchegg, potok	K17-14-1	823	CTAB
trichophyllus s.l.	AT, Göritz, řeka Steyr	AT-02-2	813	CTAB
trichophyllus s.l.	AT, Feistritz, potok	K18-25-1	821	CTAB

Tabulka 2: Seznam vzorků pro první část PCR s M13 značeným primerem. Význam sloupců odpovídá *Tabulce 1*.

Taxon	Populace	Kód	Číslo	Izolace DNA
trichophyllus A	CZ, Strýčice, rybník	K15-20-1	232	
trichophyllus A	CZ, Vlčkov, písčokovna	K13-24-1	364	
trichophyllus A	CZ, Volary, potok	K12-23-2	550	
trichophyllus A	AT, Rudmanns, rybník	K17-31-2	501	
trichophyllus B	CZ, Radomyšl, rybník	K14-39-1	310	
trichophyllus B	CZ, Horní Jiřetín, výsypka	K14-22-1	316	
trichophyllus B	CZ, Marchegg, potok	K17-14-1	390	
trichophyllus B	AT, Großweikersdorf, řeka Schmida	K18-46-1	588	

Tabulka 3: Seznam vzorků pro druhou část PCR s M13 značeným primerem. Význam sloupců odpovídá *Tabulce 1*.

Taxon	Populace	kód	Číslo	Izolace DNA
trichophyllus A	CZ, Běstvína, rybník	K11-25-1	257	
trichophyllus A	CZ, Běstvína, rybník	K11-25-2	258	
trichophyllus A	CZ, Běstvína, rybník	K11-25-3	259	
trichophyllus A	CZ, Běstvína, rybník	K11-25-4	899	NaOH
trichophyllus A	CZ, Volary, potok	K12-23-1	443	
trichophyllus A	CZ, Volary, potok	K12-23-2	550	
trichophyllus A	CZ, Volary, potok	K12-23-3	47	NaOH
trichophyllus A	CZ, Volary, potok	K12-23-4	48	NaOH
trichophyllus A	CZ, Krnov-Chomýž, rybník	K13-10-1	12	NaOH
trichophyllus A	CZ, Krnov-Chomýž, rybník	K13-10-2	301	
trichophyllus A	CZ, Krnov-Chomýž, rybník	K13-10-3	822	
trichophyllus A	CZ, Krnov-Chomýž, rybník	K13-10-4	900	NaOH
trichophyllus A	CZ, Vlkov, pískovna	K13-24-2	364	
trichophyllus A	CZ, Hradešice, ryb. Strašný	K15-20-1	232	
trichophyllus A	CZ, Hradešice, ryb. Strašný	K15-20-2	233	
trichophyllus A	CZ, Hradešice, ryb. Strašný	K15-20-3	234	
trichophyllus B	HU, Sarród, slanisko	HU-03-1	676	NaOH
trichophyllus B	HU, Sarród, slanisko	HU-03-2	903	NaOH
trichophyllus B	HU, Sarród, slanisko	HU-03-3	904	NaOH
trichophyllus B	HU, Sarród, slanisko	HU-03-4	905	NaOH
trichophyllus B	CZ, Novosedly, rybník	K14-19-1	311	
trichophyllus B	CZ, Novosedly, rybník	K14-19-2	444	
trichophyllus B	CZ, Novosedly, rybník	K14-19-3	150	NaOH
trichophyllus B	CZ, Radomyšl, rybník	K14-39-1	310	
trichophyllus B	CZ, Radomyšl, rybník	K14-39-2	114	NaOH
trichophyllus B	CZ, Radomyšl, rybník	K14-39-3	115	NaOH
trichophyllus B	CZ, Radomyšl, rybník	K14-39-4	901	NaOH
trichophyllus B	AT, Tadtén, odvodňov. příkop	K17-16-1	659	
trichophyllus B	AT, Tadtén, odvodňov. příkop	K17-16-2	660	
trichophyllus B	AT, Tadtén, odvodňov. příkop	K17-16-3	661	
trichophyllus B	AT, Tadtén 2, odvodňov. příkop	K17-17-1	383	
trichophyllus B	AT, Tadtén 2, odvodňov. příkop	K17-17-2	902	NaOH

Údaje k lokalitám neuvedeným v Prančl et al. (2018) a Koutecký et al. (2022):

- K18-10 PL, Sandomierz, slepé rameno řeky, 50°41'02"N, 21°46'46"E, leg. P. Koutecký, 9. 6. 2018
- HU-01 HU, Mescsér, řeka Mosoni-Duna, 47°47'57"N, 17°28'25"E, leg. P. Koutecký, Z. Kaplan & M. Lučanová, 7. 5. 2019
- K19-19 CZ, Nová Včelnice, rybník Velká Perut', 49°14'33"N, 15°06'27"E, leg. P. Koutecký & V. Dolejšek, 13. 6. 2019
- K19-05 HU, Szeksárd, pískovna, 46°20'12"N, 18°45'16"E, leg. A. Mesterházy, 23. 5. 2019
- K18-43 CZ, Lipí, ryb. Haberský Mlýnský, 48°57'25"N, 14°20'39"E, leg. P. Koutecký, 9. 9. 2018
- AT-02 AT, Göritz, řeka Steyr, 47°51'12"N, 14°11'20"E, leg. P. Koutecký, Z. Kaplan & M. Lučanová, 30. 7. 2018
- K18-25 AT, Feistritz ob Bleiburg, potok, 46°33'28"N, 14°45'59"E, leg. P. Englmaier, 25. 6. 2018

3.2 Izolace DNA

3.2.1 CTAB

Skupina prvních zkušebních 16 vzorků byla sesbírána ještě před začátkem práce v laboratoři. Vzorky ovšem nebyly vyizolovány, tudíž jsme si společně s Lucií Sázavskou každý vyizolovali 8 vzorků. Pro tyto vzorky byla použita metoda CTAB (Koutecký & Košnar 2018).

Do 1.5ml zkumavek bylo přidáno asi 5 mg suché rostlinné tkáně. Následně byly do každé zkumavky přidány dvě kovové kuličky. Takto naplněné zkumavky byly vloženy do oscilačního mlýnku Retsch 400MM na dobu jedné minuty. K rozdrčenému materiálu bylo přidáno 700 μ l zásobního roztoku CTAB a 10 μ l 2-merkptoethanolu. Pipetování probíhalo v digestoři. Po napipetování roztoků byl obsah zkumavek ručním protřepáním promíchán. Následně byly zkumavky vloženy na 30 minut do termo třepačky nastavené na 50 °C. Po vyndání zkumavek z termo třepačky byly zkumavky centrifugovány po dobu jedné min při 10 000 rpm.

Do nových 1.5ml zkumavek byl přepipetován obsah původních zkumavek, kuličky byly sesypány do malé kádinky, řádně propláchnuty a osušeny. Dále bylo opět v digestoři přidáno 500 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol v poměru 24:1. Zkumavky byly lehce promíchány v ruce, nechány odstát, a nakonec opět centrifugovány po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Po centrifugaci se vytvořila ve zkumavce vodní báze, která obsahovala právě námi potřebnou DNA. Vodní báze byla tedy v digestoři přepipetována do nových 1.5ml zkumavek, chloroform z původních zkumavek byl slit do odpadní nádoby, taktéž použité špičky byly vhazovány do příslušných nádob.

Následně bylo do zkumavek napipetováno 500 μ l vychlazeného isopropanolu, zkumavky byly párkrát převráceny a nechány asi 30 minut odstát při teplotě -20 °C. Po uplynulé době byly centrifugovány 5 minut při 13 000 rpm. V digestoři byl supernatant ze zkumavek opatrně odpipetován do odpadní kádinky. Na dně zkumavky se vytvořil lehce bílý pelet DNA. K peletkám do zkumavek bylo přidáno 400 μ l 96% ethanolu z mrazáku a poklepáním na zkumavku se podařilo uvolnit pelet od stěny zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány pět minut při 13 000 rpm. Supernatant byl opět odpipetován do odpadní kádinky. Poté bylo přidáno 200 μ l vychlazeného 70% ethanolu, na zkumavku bylo poklepáno, aby se pelet uvolnil od stěny, a to celé se nechalo cca 5 minut stát při pokojové teplotě. Zkumavky byly centrifugovány pět minut při 13 000 rpm. Supernatant byl opět odpipetován

do odpadní kádinky. Následně byly otevřené zkumavky nechány při pokojové teplotě vyschnout. K vysušenému peletu bylo přidáno 50 μ l sterilní vody.

Ještě před uschováním vzorků do mrazicího boxu je potřeba nechat zkumavky nechat přes noc stát v lednici, aby se DNA rozpustila. Poté byly zkumavky uschovány do mrazicího boxu s teplotou $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 NaOH

Pro další analýzy (variabilita v populacích apod.) byla již část vzorků k dispozici v podobě izolátů DNA, menší množství vzorků bylo třeba doplnit. Pro ty byla použita metoda NaOH (Koutecký & Košnar 2018).

Do 1.5ml zkumavek bylo přidáno malé množství suché rostlinné tkáně (cca 2-3 koncové úkrojky listu) a k tomu bylo přidáno 20 μ l 0.5M NaOH. Materiál byl rozdrcen pomocí malého homogenizátoru, který byl před drcením ponořen v jemném sterilním písku. Po rozdrcení byly zkumavky centrifugovány na 2 minuty při 13 000 rpm. Do nových zkumavek bylo přidáno 20 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 8.3) a poté 2 μ l supernatantu. Následně byly vzorky uschovány do mrazicího boxu s teplotou $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Primery

Dalším krokem bylo nalezení úseků DNA obsahujících mikrosatelity a navrhnutí primerů pro jejich nadcházející amplifikaci pomocí PCR. Primer je uměle na zakázku vytvořený jednovláknový oligonukleotid, který je nadesignovaný tak, aby byl komplementární k určitému úseku DNA (Watson et al. 2014). Primery vyznačují začátek a konec úseku, který chceme amplifikovat pomocí DNA polymerázy (Alberts et al. 2018), a podle směru čtení DNA úseku se označují jako reverse a forward primery.

Pro vyhledávání mikrosatelitních lokusů a vytvoření primerů byla použita metodika podle článků Kúr et al. (2014) a Drag et al. (2013). Tuto část provedl školitel (sběr vzorků a izolace DNA) a konzultant práce, Jiří Košnar, všechny další kroky. Bylo vybráno sedm druhů lakušníků (jeden vzorek na každý druh), konkrétně *R. aquatilis*, *R. circinatus*, *R. fluitans*, *R. peltatus*, *R. trichophyllus* (cytotypy A a B) a kříženec z rakouských Alp podobný *R. trichophyllus*. DNA byla enzymaticky naštěpena na menší fragmenty. Dále byly ze směsi fragmentů pomocí magnetických kuliček nesoucích na svém povrchu mikrosatelitní sekvence vyextrahovány komplementární fragmenty, z nich značný podíl tedy obsahuje mikrosatelit. K těmto fragmentům byla připojena sekvence unikátní pro každý vzorek

(„barcode“) a fragmenty byly následně smíchány, tím vznikla tzv. obohacená knihovna fragmentů. Ta byla osekvenována u firmy SEQme (Doříš, ČR) jednou z metod tzv. sekvenování nové generace, konkrétně na přístroji PacBio. Následně bylo od firmy obdrženo asi sto tisíc sekvencí, které byly pomocí *barcode* rozřazeny podle taxonu. Sekvence následně byly podle podobnosti seřazeny do skupin (lokusy, tj. sekvence z jedno místa v genomu) a byly vyhledávány lokusy, které jsou pro daný druh reprezentovány několika sekvencemi (což umožňuje korigovat občasné sekvenační chyby) a obsahují mikrosatelitní motiv. Takto bylo vybráno celkem 333 lokusů pro *R. trichophyllus* A a 358 lokusů pro *R. trichophyllus* B. Pro tyto lokusy jsou postupně navrhovány primery pro PCR amplifikaci, jejíž provedení a testování je hlavní součástí méj bakalářské práce.

Pro *R. trichophyllus* A bylo zatím nalezeno a vyzkoušeno 15 lokusů. Pro *R. trichophyllus* B bylo vyzkoušeno zatím 16 lokusů. V *Tabulce 4* lze vidět v prvním sloupci název lokusu, který se skládá z počátečního písmena A, B, F nebo P (podle toho, na jaký taxon byl vyvinut – *R. trichophyllus* A, *R. trichophyllus* B, *R. fluitans* nebo *R. peltatus*), dále z motivu mikrosatelitu AC a poslední část názvu tvoří unikátní číslo. V dalším sloupci lze vidět sekvenci forward a reverse primeru, dále teplotu nasedání primerů (*annealing temperature*) a přibližnou délku PCR produktu.

Na konci tabulky si lze všimnout primerů pro pět lokusů vyvíjených na jiné taxony, než zkoumá tato práce. Tyto primery byly přidány až po provedení PCR a následném zobrazení gelovou elektroforézou, kde se ukázala úspěšná amplifikace těchto lokusů na *R. trichophyllus* A a B.

Tabulka 4: Názvy použitých lokusů, sekvence primerů, teplota nasedání primerů (*annealing temperature*) a přibližná délka PCR produktu. R znamená „reverse“, Ft znamená „forward-tailed“, tj. k tomuto primeru byla kromě specifické části přidána na začátek sekvence („tail“) komplementární k M13 primeru (TGTAACGACGGCCAGT).

Lokus	Primer	Annealing	Délka SSR
A-AC-03	Ft: GCATCGTACCTTAGAGAACAACA	50	150–180
	R: TTTCTATCACCTCGCAGTCTC		
A-AC-19	Ft: ATGCCGTAATAGGTGCGAAT	56	370
	R: GGTCAAGTGCCCCCTCTG		
A-AC-68	Ft: TGAAAATGAAAATTCAGATATCACAT	50	420–430
	R: TTGAAATGATAGTCAGACCCTGT		
A-AC-81	Ft: AAAATGTCCCTACAACATCCAAA	56	350–370
	R: CGTGACCTAATCTAGCACTCAGTT		
A-AC-86	Ft: AATCGTGAAATGACGGGAGT	56	230–270
	R: TGGACTAACAGAGGGAGATGAA		
A-AC-109	Ft: TGCACCTAGCAAGTTTTGGA	54	160–170
	R: GCAGAGAGGAGAACATGTGGA		
A-AC-128	Ft: GAAATGACATATTCTTCCTCTTCTCT	50	250
	R: TCAGTCTCTAGAAATCAGTTAATACGA		
A-AC-132	Ft: TGGAATAAAGAAAACGGAAAA	56	230–270
	R: CGGACCCAACTTGTATTAAGG		
A-AC-133	Ft: TGAGCACCATTATTTGTCAATG	56	240
	R: GGATAAATGGGTAAGGACACCTC		
A-AC-135	Ft: CCCCTGATTACAACCTTTGC	56	170
	R: GCTTTTGCACTTTTGGAAGG		
A-AC-143	Ft: CAATGCGCACCTAATTACA	60/58	380
	R: AGATCTAGAATTGGTGGATGGA		
A-AC-156	Ft: CCTACTCCGTATGAACCCAGA	56	240
	R: TCAATGCTGGAGAGGTAAGG		
A-AC-191	Ft: CTCGTAACCTCTTGAGATGAAC	54	115
	R: CGTGTAACAATGGCAAAGAA		
A-AC-229	Ft: GTGATGCTGCAACCTGTACG	54	130
	R: AAAGGCATGGGATTGGTATG		
A-AC-252	Ft: CACTCTTCGGGTCAGGTT	54	300
	R: CACTCTTCGGGTCAGGTT		
B-AC-10	Ft: AATTGGGTTTCCCACTCCATAC	48	240
	R: TTGAAGGAAGAATGGGAATTG		
B-AC-12	Ft: GATCCATCCATCTGAAAATCT	50	150–210
	R: ATCGGGCATTATCTGATTGTA		
B-AC-32	Ft: TTTCAATTTACCGAGTTTCCT	48	140
	R: CGAGAAACGAGTAGTAATGAAGTTG		

B-AC-75	Ft: CATTCTTCTCTGCATTGCTTC	56	380
	R: GGCCTTTTGTGAGTGAGAGT		
B-AC-161	Ft: TTATTA AAAACTGCGGACTGCATA	48	270–300
	R: AATTCAATATTCCAAATAAACAAACC		
B-AC-164	Ft: CGGAAATGAACCGAAAAGAA	56	270–300
	R: TGGTTAGTTGCACCCGATCT		
B-AC-183	Ft: ACACACCACGTATGAACTCG	54	300–320
	R: TGTCCCATACACATGCAAAA		
B-AC-198	Ft: CTCTACA AACTTATGGTGTGACATCT	54	155–215
	R: TTGTCAACTCTTAAAACGGAACG		
B-AC-206	Ft: GCCAAGTTCAAGAATATCAGCA	54	200
	R: TTTTGGGTTTCCCATGAT		
B-AC-263	Ft: GGGAGGTATGGTTAGGGATGA	56	290–310
	R: AGCAAATCAGAGCCGAAAAA		
B-AC-287	Ft: TATGGGGTGTCCATTTAC	56	180
	R: TGAGATGGATGTCTTGATTTGG		
B-AC-297	Ft: AATTGAGACTTCGGGCTCAG	56	305–345
	R: AACACCAA AACTTTGCCTGTAA		
B-AC-299	Ft: CTTGGAGGCGGTGAACAT	56	390–430
	R: AAAGGAAACTGCAGCCAGAA		
B-AC-302	Ft: TTGCCAGTCATCAAGCAAGT	58	450
	R: TGGAGGACAAATTGGAGGAG		
B-AC-327	Ft: TGGACCTTTTCACCAACTAAA	58	470
	R: CCAAGATACCAAAGAGGATGGA		
B-AC-349	Ft: GCAAGGCCAGTATGGTTGTC	54	400
	R: CGTTTCCTGCAATTTTATCATTTATC		
F-AC-40	Ft: GTAGACATGTTCTATGACAATAAATAC	48	300
	R: CAACATTCCAAATAACCAACT		
F-AC-72	Ft: CAAGTGAAACCAGGCTCTCC	50	250
	R: TCCAAAATGGAGAATTGCTG		
F-AC-78	Ft: GGCTCCTCTTAATCAGTCTCTCTT	56	230
	R: GGGTGTGAGGAATTTGGATG		
F-AC-85	Ft: TGGAGGCACAGATTACACCTT	56	230–290
	R: ATCGGGTCTCGGTCCATT		
F-AC-91	Ft: TATTTGGCTGGTCCCTTTGT	56	140–150
	R: ACCCAAAGATCCAATGCAAG		
P-AC-71	Ft: CCAACTGGGCTGTGTAACCC	48	230
	R: ACTTGCCAACTCAGGTCCAG		
P-AC-159	Ft: CCTTCGATACGCCTTTGTGT	56	275–300
	R: CAATCTGCTCACCCCAAAC		

3.4 PCR

Vyizolovaná DNA byla použita pro amplifikaci jednotlivých lokusů obsahujících mikrosatelity. K amplifikaci byly použity primery uvedené v *Tabulce 4* na straně 17.

Objem jedné reakce činil celkem 5.5 μ l skládající se z 1.49 μ l H₂O, 0.33 μ l každého primeru při koncentraci 5 μ M, 2.75 μ l Plain PP Master Mix, případně Plain Combi PP Master Mix, od firmy Top-Bio, Česká republika. Na závěr bylo přidáno 0.5 μ l DNA. Objem všech reakcí zvětšený o jeden nebo dva vzorky byl nejdříve napipetován do jedné zkumavky, bez DNA. Následně byl objem rozdělen podle počtu vzorků do jednotlivých zkumavek, nejčastěji do 16 zkumavek. Původní zkumavka se zbytkem reakční směsi byla použita jako kontrolní, nebyla do ní poté přidána žádná DNA. Takto připravené vzorky byly následně proklepány, aby byly zbaveny bublin vzniklých pipetováním, a poté krátce centrifugovány ve stolní centrifuze. Ještě před vložením DNA byl na cycleru vybrán určitý program, který se skládá z šesti fází. První fáze, počáteční denaturace, probíhá při teplotě 94 °C a trvá 5 minut. Druhá fáze, cyklová denaturace, probíhá při teplotě 94 °C a trvá 30 vteřin. Třetí fáze, nasedání primerů, se děje při teplotě, která je specifická pro daný primerový pár a je uvedena v *Tabulce 4* na straně 17. Teplota se většinou pohybuje v rozmezí 48–60 °C, a celá fáze trvá 30 vteřin. Dále následuje čtvrtá fáze, cyklová elongace, která trvá 45 vteřin při teplotě 72 °C. Druhá až čtvrtá fáze se opakují ve 40 cyklech. Po dokončení všech cyklů nastává pátá fáze, finální elongace, kde po dobu 10 minut přetrvává teplota 72 °C. V konečné šesté fázi dochází ke zchladnutí až na 15 °C.

Dále následuje zobrazení vzorků pomocí gelové elektroforézy. Podle výsledků mohou být konkrétní vzorky odeslány na sekvenační analýzu pro ověření přítomnosti mikrosatelitu.

3.5 PCR s M13 primery

Metoda PCR s M13 primerem je metoda používaná pro analýzu délky amplifikovaného produktu PCR. Aby bylo možné zjistit délku produktu pomocí kapilární elektroforézy, musí jeden z primerů nést fluorescenční značku. Tato značka se přichytává na část nazývanou „tail“ (Schuelke 2000). Z toho vzniklo označení pro jeden primer "forward-tailed", tudíž primer, který obsahuje speciální sekvenci, která umožňuje vnést do fragmentů fluorescenční značení pomocí modifikované PCR. Mnou použité fluorescenčně značené primery byly zakoupeny u společnosti Applied Biosystems a jednalo se o barvy 6-FAM (modrá), VIC (zelená), NED (žlutá) a PET (červená).

Tato metoda byla zkoušena ve dvou krocích. Pro první krok byly vybrány vzorky z *Tabulky 2* na straně 11, jednalo se o osm vzorků z osmi různých populací. Pro druhý krok byly vybrány vzorky z *Tabulky 3* na straně 12, jednalo se vždy o 1–4 vzorky z každé z 10 populací. Celkem bylo vybráno 32 vzorků.

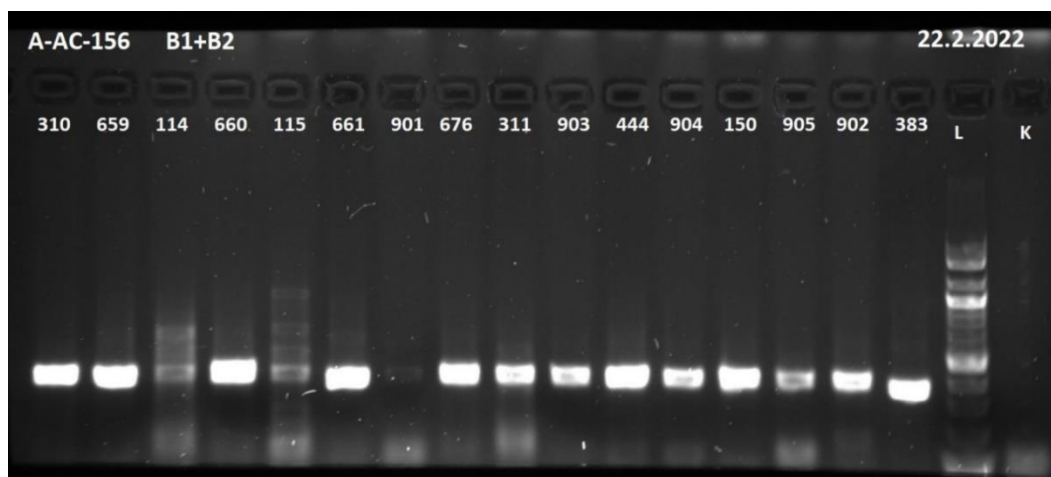
Postup reakce je velmi podobný jako při PCR popisované v předchozí kapitole. Objem jedné reakce činil celkem 5.5 μl skládající se z 1.18 μl H_2O , 0.66 μl fluorescenčně značeného M13 primeru při koncentraci 2.5 μM , 0.08 μl *forward-tailed* primeru při koncentraci 5 μM , 0.33 reverse primeru při koncentraci 5 μM , 2.75 μl Plain PP Master Mix, případně Plain Combi PP Master Mix, od firmy Top-Bio, Česká republika. Na závěr bylo přidáno 0.5 μl DNA. Objem všech reakcí zvětšený o jeden vzorek byl nejdříve napipetován do jedné zkumavky, promíchán, a následně rozpipetován do jednotlivých zkumavek. Zbytek směsi sloužil jako negativní kontrola. Připravené vzorky byly následně proklepány a poté krátce stočeny ve stolní centrifuze. Ještě před vložením DNA byl na cycleru vybrán určitý program, který se skládá z devíti fází. První fáze, počáteční denaturace, probíhá při teplotě 94 °C a trvá 3 minuty. Druhá fáze, cyklová denaturace, probíhá při teplotě 94 °C a trvá 30 vteřin. Třetí fáze, nasedání primerů, se děje při teplotě, která je specifická pro daný primerový pár (*Tabulka 4* na str. 17). Teplota se většinou pohybuje v rozmezí 48–60 °C, a celá fáze trvá 30 vteřin. Dále následuje čtvrtá fáze, cyklová elongace, která trvá 1 minutu při teplotě 72 °C. Druhá až čtvrtá fáze opakují ve 33 cyklech. Po dokončení všech cyklů nastává pátá fáze, probíhá při teplotě 94 °C a trvá 30 vteřin. Šestá fáze, nasedání M13 značeného primeru, se děje při teplotě 46 °C a trvá 30 vteřin. Dále následuje sedmá fáze, která trvá 1 minutu při teplotě 72 °C. Pátá až sedmá fáze se opakují v 11 cyklech. Po dokončení všech cyklů nastává osmá fáze, finální elongace, kde po dobu 10 minut přetrvává teplota 72 °C. V konečné deváté fázi dochází ke zchladnutí až na 15 °C.

Dále následuje zobrazení vzorků pomocí gelové elektroforézy, poté odeslání na fragmentační analýzu.

3.6 Gelová elektroforéza

Po PCR přichází na řadu gelová elektroforéza, což je metoda, při které dochází k zobrazení produktů PCR. Stručně řečeno se jedná o pohyb fragmentů DNA skrz gel v elektrickém poli, kde se separují různě dlouhé fragmenty (Westermeier 2013). K tomu byla potřeba vana, pufr, gel, fluorescenční barvivo a zdroj elektrické energie. Nejdříve byl smíchán 1 μ l DNA s 0.5 μ l modrého nanášecího pufru (loading dye) obsahujícího barvivo GelRed, a poté byla směs nanášena do jamek na 1.5% gel, který byl ponořen ve vaně naplněné pufrům TBE. K vaně byl připojen zdroj energie a puštěn elektrický proud. To způsobilo postup DNA gelem. Jelikož má DNA záporný náboj, postupují fragmenty ke kladnému pólu. Kratší fragmenty se gelem pohybují rychleji, tudíž nejdále od jamek budou právě ty krátké a nejbližší ty dlouhé. Pro zobrazení byl gel přenesen pod UV světlo, kde byl vyfotografován. Díky fluorescenčnímu značení se v místě, kde je přítomna DNA, objeví světlé proužky na tmavém pozadí, které ukazují přibližnou délku fragmentu a také množství naamplifikovaného materiálu (čemuž odpovídá intenzita proužku). Přibližná délka se odečítá pomocí ladderu (žebříčku), který je na gel také přidán a u kterého známe délku jednotlivých proužků (používali jsme ladder od firmy NEB s proužky ve vzdálenosti 100 bp). Na gel je také přidána negativní kontrola ukazuje, zde nedošlo ke kontaminaci reakční směsi (nesmí v ní být viditelný proužek DNA).

Na *Obrázku 6* je ukázka gelu. Z obrázku lze říci, že PCR proběhla u všech vzorků kromě 901, který obsahuje pouze velmi slabý proužek, jako K je označena negativní kontrola. U vzorků 114, 115 se vytvořily i tzv. nespecifické produkty (tzn. neodpovídající předpokládané délce lokusu). Je tudíž možné, že primery nasedají i na jiná místa v genomu. Ovšem podrobnější informace získáme až z fragmentační analýzy.



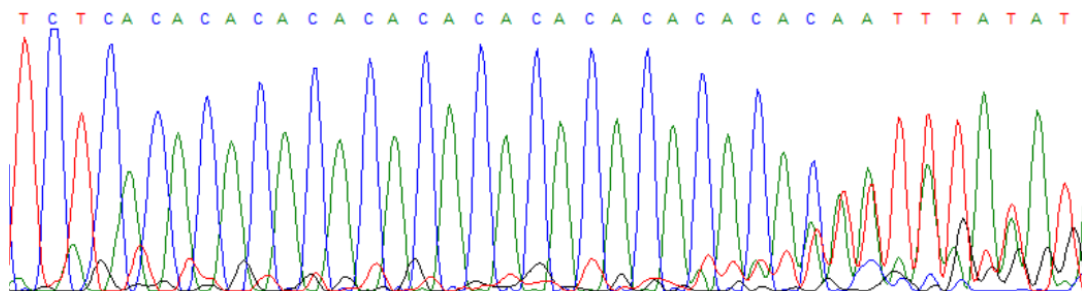
Obrázek 6: Zobrazení produktů PCR amplifikace primerem A-AC-156.

3.7 Sekvenační analýza

Sekvenační analýza je metoda, při které dochází k získání přesného pořadí výskytu nukleotidů v DNA. V této práci byla tato metoda použita pro ověření přítomnosti mikrosatelitní sekvence v amplifikovaném produktu PCR a také pro spočítání počtu opakování.

Pro přípravu na sekvenování byl na jeden vzorek potřeba 1 μ l DNA z PCR reakce, 0.5 μ l Exo-SAP (kombinace dvou enzymů, které odbourají zbylé nukleotidy a primery použité pro PCR reakci) a 3.5 μ l vody. Zkumavky byly následně promíchány proklepnutím prstem a krátce stočeny na stolní centrifuze. Poté byly vzorky umístěny do cykleru s programem, který obsahoval tři kroky. První krok trval 15 minut při teplotě 37 °C (pro aktivitu enzymů), druhý krok trval také 15 minut při teplotě 85 °C (inaktivace enzymů), ve třetím kroku dochází ke zchladnutí až na 15 °C. Po dokončení programu byly vzorky přepipetovány do 1.5ml zkumavek podle norem firmy. Dále byl přidán primer, od kterého probíhá sekvenace (nejčastěji šlo o *forward-tailed* primer), na zkumavky byly nalepeny čárové kódy a následně byly odeslány firmě Eurofins Genomics, Německo.

Ke čtení souborů se sekvencemi byl použit program FinchTV. Na *Obrázku 7* vidíme výstřižek ze sekvence amplifikovaného produktu lokusu A-AC-164.



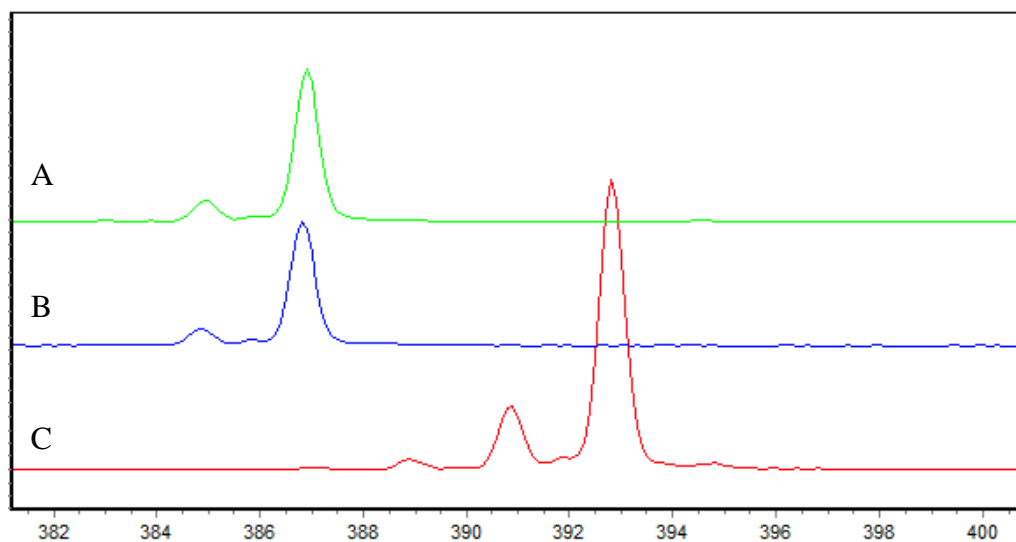
Obrázek 7: Mikrosatelitní sekvence s 13 opakováními motivu AC.

3.8 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza nebo také kapilární elektroforéza, z anglického *capillary electrophoresis*, je metoda analyzující nukleové kyseliny (Karger & Guttman 2009). Fluorescenčně označené DNA fragmenty jsou rozděleny dle velikosti a náboje podle toho, jak postupují kapilárou. K detekci slouží laserové okénko, přes které prochází jak námi dodané fragmenty, tak i fragmenty velikostního standardu. Tyto firmou vytvořené fragmenty jsou značeny specifickým barvivem a slouží k výpočtu velikostí našich produktů. Výsledkem jsou tzv. „peaky“, jejichž velikost závisí na intenzitě fluorescence (Greenough et al. 2016). Fragmentační analýza se používá pro analýzu polymorfismů v délce fragmentů, např. pro analýzu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), mikrosatelitní analýzu a detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP) (Mitchelson 2001), jelikož kapilární elektroforéza zajišťuje až jednobázové rozlišení (Mitchelson 2003).

Krok fragmentační analýzy navazuje na část popisovanou v podkapitole PCR s M13 primery na straně 19. Vzorky byly zabaleny a odeslány firmě SEQme s.r.o., Česká republika. Výsledky byly studovány v programu GeneMarker.

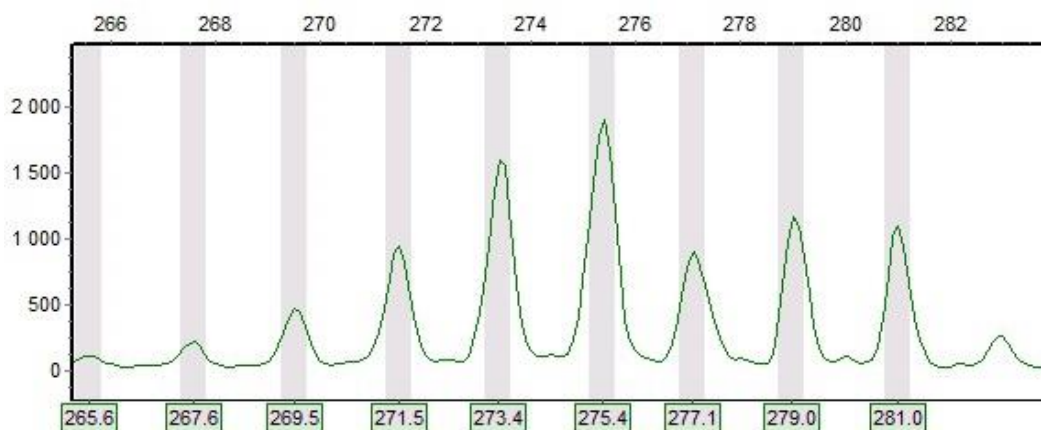
Tato metoda mi dala přesnou délku amplifikovaného produktu z PCR. Díky tomu bylo možné srovnat délku produktů uvnitř jedné populace a následně je srovnat s ostatními populacemi. Na *Obrázku 8* vidíme srovnání délky alel stejného lokusu u třech vzorků, kde osa X udává délku fragmentu v počtu bází a osa Y udává intenzitu fluorescence. Vzorek A a B jsou z jedné populace a u obou vzorků lokus čítá délku celkem 387 bází. Vzorek C je z jiné populace a vidíme, že ten samý produkt je dlouhý 393 bází.



Obrázek 8: Porovnání velikosti lokusů u třech vzorků.

4 Výsledky

Nejdříve jsem udělal PCR na 16 vzorcích různých druhů zaměřenou celkem na 31 lokusů, které byly navrženy na základě sekvencí *R. trichophyllus* cytotypů A a B (tato písmena jsou pak použita na začátku názvu lokusů). Po vyhodnocení výsledků gelové elektroforézy byly vyřazeny lokusy, které i po změně teploty nasedání primerů amplifikovaly nespecifické produkty nebo které byly osekvenovány a vykazovaly příliš krátká opakování. U některých lokusů nedošlo k amplifikaci vůbec, tudíž byly také vyřazeny. Dále jsem lokusy posuzoval jen ve vztahu k *R. trichophyllus*, informace pro ostatní druhy bude využita pro jiné studie. Pro cytotyp A i B bylo vyřazeno 8 lokusů, z čehož 4 byly stejné pro oba cytotypy. Dalším krokem byla první PCR s M13 primerem pro lokusy, které prošly první PCR. Zde byla tato metoda testována celkem na 8 vzorcích, konkrétně na 4 vzorcích *R. trichophyllus* A a 4 vzorcích *R. trichophyllus* B. Po provedení byly vzorky odeslány na fragmentační analýzu a poté v programu GeneMarker vyhodnoceny. Lokusy, které měly příliš mnoho píku, a tím byly nečitelné pro vyhodnocení, byly vyřazeny. Příklad takového lokusu lze vidět na *Obrázku 9*. Vyřazeny byly i lokusy, kde rozdíl mezi alelami neodpovídal délce repetice (tj. nebyl v násobcích 2, což ukazuje na délkové mutace v okolní „flanking“ sekvenci). Celkem bylo vyřazeno 14 lokusů pro každý cytotyp, z nichž společných pro oba cytotypy bylo 11 lokusů. Následující krok byla opět PCR s M13 primerem. Vzorky pro oba cytotypy se skládaly z 16 jedinců. U cytotypu A i B byly vzorky sebrány z 5 různých populací, přičemž se vždy jednalo o 2–4 vzorky z jedné populace. Následně byly vzorky opět vyhodnoceny v programu GeneMarker a kvůli nečitelnosti bylo u cytotypu B vyřazeno 5 lokusů a u cytotypu A lokusy 2. Společně sdílely jeden lokus. Souhrn výsledků jednotlivých kroků je vypsán v *Tabulce 5*. Číselný souhrn výsledků se nachází v *Tabulce 6*.



Obrázek 9: Příklad nečitelného výsledku fragmentační analýzy.

Tabulka 5: Souhrn výsledků PCR, fragmentační analýzy 1, fragmentační analýzy 2 a výsledný počet alel pro každý lokus. Vysvětlivky: ok = proběhlo v pořádku, nespec. = nespecifické produkty, nečit. = nečitelné, unif. = uniformní. Písmena A a B značí cytotypy druhu *R. trichophyllus*.

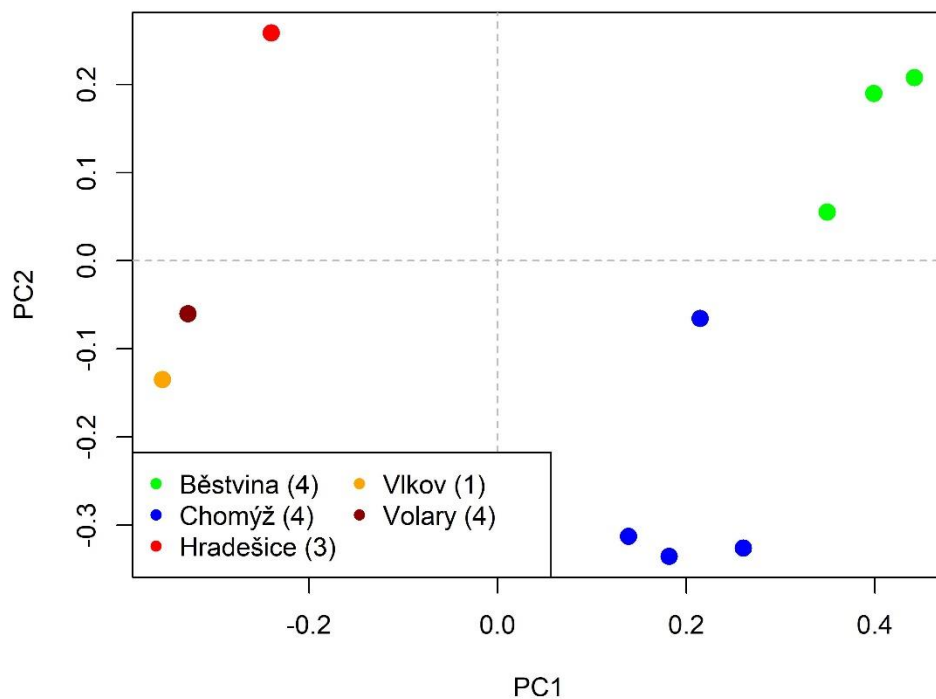
Lokus	PCR		Frag. 1		Frag. 2		Počet alel	
	A	B	A	B	A	B	A	B
A-AC-03	ok	ok	nečit.	nečit.				
A-AC-19	nespec.	nespec.						
A-AC-68	ok	nespec.	nečit.					
A-AC-81	ok	ok	nečit.	nečit.				
A-AC-86	ok	ok	ok		unif.		1	
A-AC-109	ok	nespec.	ok		unif.		1	
A-AC-128	ok	ok	nečit.	nečit.				
A-AC-132	ok	ok	ok	nečit.	nečit.			
A-AC-133	ok	nic	ok		unif.		1	
A-AC-135	slabý	slabý						
A-AC-143	ok	slabý	ok		ok		3	
A-AC-156	ok	ok	ok	ok	unif.	nečit.		
A-AC-191	ok	ok	ok		ok		3	
A-AC-229	ok	ok	ok	ok	ok	ok	3	4
A-AC-252	ok	ok	nespec.	krátký				
B AC-10	krátký	krátký						
B AC-12	ok	ok	ok	ok	unif.	ok	1	5
B AC-32	nic	nic						
B-AC-75	nespec.	ok		ok		ok		2
B AC-161	nespec.	ok		ok		nečit.		
B AC-164	ok	ok	nečit.	nečit.				
B AC-183	slabý	ok		ok		ok		3
B-AC-198	ok	ok	nespec.	nespec.				
B-AC-206	krátký	ok		ok		nečit.		
B-AC-263	ok	ok	ok	ok	ok	ok	2	5
B-AC-287	ok	slabý	ok	ok	unif.	ok	1	3
B-AC-297	ok	ok	posun	posun				
B-AC-299	ok	ok	nečit.	ok		ok		3
B-AC-302	ok	ok	ok	ok	ok	ok	2	5
B-AC-327	nespec.	nespec.	nečit.	nečit.				
B-AC-349	ok	ok	ok	ok	ok	ok	2	4
F-AC-40	ok	ok	nečit.	nečit.				
F-AC-72	ok	ok	unif.	unif.				
F-AC-78	ok	ok	ok	ok	ok		6	
F-AC-91	ok	ok	nečit.	nečit.				
P-AC-71	ok	nespec.	unif.					
P-AC-159	nespec.	ok		ok		ok		4
F-AC-85	nespec.	ok		ok		nečit.		

Tabulka 6: Výsledný číselný souhrn.

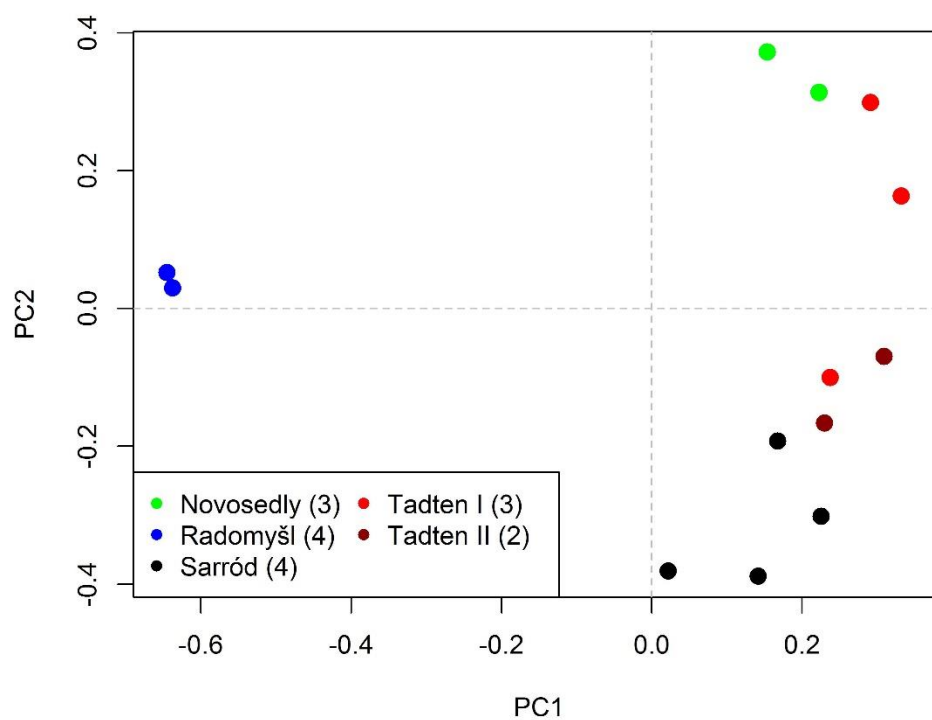
Souhrn	
Celkový počet zkoumaných lokusů na cytotypu A	36
Celkový počet zkoumaných lokusů na cytotypu B	37
Počet společných lokusů pro oba cytotypy	31
Počet lokusů vyřazených po PCR pro cytotyp A	8
Počet lokusů vyřazených po PCR pro cytotyp B	8
Počet lokusů vyřazených po prvním kole frag. analýzy pro cytotyp A	14
Počet lokusů vyřazených po prvním kole frag. analýzy pro cytotyp B	14
Počet lokusů vyřazených po druhém kole PCR s M13 pro cytotyp A	2
Počet lokusů vyřazených po druhém kole PCR s M13 pro cytotyp B	5
Počet úspěšných lokusů pro cytotyp A	12
Počet úspěšných lokusů pro cytotyp B	10
Počet společných úspěšných lokusů pro oba cytotypy	6
Celkový počet nalezených alel pro cytotyp A	26
Celkový počet nalezených alel pro cytotyp B	39

Dále byla provedena analýza hlavních koordinát (s jejímž výpočtem mi pomohl školitel, proto neuvádím v metodice detaily výpočtu). Protože oba cytotypy *R. trichophyllus* jsou tetraploidní (Prančl et al. 2018), byla hodnocena jen přítomnost/nepřítomnost alely. Tato data byla vyhodnocována v programu FAMD 1.25 a byl použit Jaccardův koeficient. Výsledný graf zobrazuje podobnost jedinců (jedinci s podobnými alelami se v grafu nachází blíže než jedinci s rozdílnými alelami). Na *Obrázku 10* je analýza pro cytotyp A. U populací Hradešice a Volary lze vidět pouze jeden bod místo 4 bodů zastupující počet jedinců analyzovaných z dané populace. Tito jedinci mají stejný genotyp, což naznačuje výskyt klonů. U populace Běstvina lze místo 4 bodů najít pouze 3, dva vzorky byly identické (klony). Na *Obrázku 11* je analýza pro cytotyp B, kde v populaci Radomyšl mají tři vzorky ze čtyř identické genotypy. V populaci Novosedly se také dva vzorky genotypově shodují.

Z těchto dat lze říci, že variabilita uvnitř populací je spíše malá a mezipopulační variabilita je významná. Je vidět také určitá geografická vazba. U *R. trichophyllus* A se oddělují populace z jihozápadních Čech (Hradešice, Volary, Vlkov) od ostatních (Běstvina – střední Čechy, Chomýž – severní Morava). U *R. trichophyllus* B se pak výrazně liší populace Radomyšl (jižní Čechy) od ostatních, které všechny pochází z panonské oblasti.



Obrázek 10: Analýzy hlavních koordinát pro cytotyp A, v závorce u názvu populace číslo počtu zkoumaných vzorků.



Obrázek 11: Analýzy hlavních koordinát pro cytotyp B, v závorce u názvu populace číslo počtu zkoumaných vzorků.

5 Diskuze

Na základě provedených analýz bylo vyselektováno celkem 12 lokusů pro cytotyp A a 10 lokusů pro cytotyp B. U obou cytotypů probíhala hlavní část zkoumání na 5 populacích, z kterých bylo sebráno od 1 do 4 vzorků. Pro oba cytotypy bylo vybráno 16 vzorků. V porovnání s články od Bricker et al. (2018) a Wu et al. (2019) jsem měl z jedné populace mnohem méně pokusných vzorků, což je způsobeno, jak už název práce říká, pouze testováním nových mikrosatelitních markerů, zda vůbec fungují. Další výzkum s již nalezenými lokusy bude směřovat analýzu většího počtu populací i vzorků z každé populace.

Z celkového počtu společných 31 lokusů jich na konci zbylo celkem 6 společných pro oba cytotypy. Vzhledem k tomu, že se jedná o stejný druh, *R. trichophyllus*, ve kterém rozlišujeme dva cytotypy (pracovní označení A a B), je počet 6 společných lokusů značně nízký. Tento výsledek potvrzuje molekulární výzkum evropských lakušníků (Koutecký et al. 2022), který nepřímě říká, že cytotypy A a B si jsou příbuzné jen vzdáleně. U cytotypu B byla nalezena jak molekulární, tak morfologická podobnost s *R. aquatilis*, jehož předkem zřejmě bude *R. trichophyllus* B. Při prvních testech PCR, které byly zkoušeny na 16 vzorcích různých druhů, byly zahrnuty i dva vzorky *R. aquatilis*. Všechny lokusy vybrané podle sekvence cytotypu B amplifikovaly na těchto dvou vzorcích *R. aquatilis* téměř identicky se vzorky *R. trichophyllus* B, z čehož vyplývá, že genom *R. aquatilis* opravdu obsahuje *R. trichophyllus* B. Zajímavé je také to, že některé lokusy vytvořené podle *R. fluitans* a *R. peltatus*, které byly testovány v jiné práci (Lucie Sázavská, zatím nedokončeno), ovšem na stejnou sadu 16 vzorků, vykazovaly na gelu opět velmi podobné výsledky jak u *R. trichophyllus* B, tak u *R. aquatilis*. To samé platí pro lokusy vytvořené podle cytotypu A, které také vykazují podobné výsledky u *R. trichophyllus* B a *R. aquatilis*. Značná podobnost mezi těmito dvěma druhy je, ovšem potřebuje samostatnou práci, která by se tímto tématem zabývala.

Mezi výslednými vhodnými lokusy pro cytotypy A se ovšem nachází i jeden lokus vyvíjený na *R. fluitans*, u cytotypu B se nachází jeden lokus z *R. peltatus*. Z celkem sedmi lokusů vyvinutých na taxony *R. fluitans* a *R. peltatus*, které na začátku vykazovaly dobrou amplifikaci na cytotypech A či B druhu *R. trichophyllus* zbyly na konci po všech analýzách pouze dva. Nejčastější důvod vyřazení těchto lokusů byla nečitelnost anebo uniformita. Jelikož se jedná o evolučně vzdálené druhy, mohlo v různých částech genomu dojít

k mutacím, např. k mutacím ve *flanking* sekvenci, která by způsobila nečitelnost anebo mohlo dojít ke ztrátě nebo zkrácení mikrosatelitu, což by způsobilo uniformitu výsledků.

Z výsledků analýzy hlavních koordinát vyplývá malá vnitropopulační variabilita. Ta může být způsobena rozmnožováním pomocí fragmentů lodyh, nebo strategií samoopylení. S tím jde ruku v ruce velikost květů. Na *Obrázku 3* na str. 6 vidíme velké květy *R. peltatus*, na *Obrázku 4* na téže straně jsou vidět malé květy *R. trichophyllus*. U taxonů s menšími květy se setkáme převážně se samoopylením, u *R. trichophyllus* dokonce někdy dochází ke speciálnímu typu samoopylení, které probíhá ještě v nerozkvetlém poupěti pod vodou, zatímco taxony s většími květy vykazují jiné rozmnožovací strategie, jako je např. přenos pylu pomocí opylovačů (Prančl et al. 2018). Jak bylo zmíněno i v části literárního přehledu, jedná se o častou, lépe řečeno typickou strategii vodních rostlin (Bricker et al. 2018). U těchto typů rozmnožování klesá podíl heterozygotů a vznikají linie čistých homozygotů a důsledkem je tedy nízká variabilita potomstva. Podobné výsledky zaznamenala i studie *R. subrigidus* (Wu et al. 2019).

Při vyhodnocování fragmentační analýzy byl v mnoha případech zaznamenán stejný výsledek velikosti alel u všech zkoumaných vzorků u lokusů pro cytotyp A, což je zřejmé i z výsledků celkového počtu alel, kde pro cytotyp B jich bylo nalezeno 39 a pro cytotyp A pouze 26. U velké části lokusů se jednalo o naprosto uniformní výsledky. Pro kontrolu správné funkčnosti těchto lokusů je potřeba pro další výzkum nechat vzorky osekvenovat a určit přesný počet opakování v mikrosatelitní sekvenci. Lokusy s malým počtem opakování bude potřeba následně vyřadit. Jak zmiňuji v úvodu, u krátkých sekvencí je velmi malá pravděpodobnost vzniku mutace (Vieira et al. 2016). Takové sekvence nemutují vůbec anebo velmi pomalu. Na druhou stranu byly lokusy použité v této práci vyvíjené přímo na tento cytotyp a v datech byl vidět dostatečný počet opakování, tudíž je možné, že se skutečně pouze jedná o uniformitu studované rostliny. Ovšem k vyslovení závěru je třeba vidět a analyzovat jejich sekvence.

6 Závěr

Vývoj mikrosatelitních markerů se ukázal jako vhodný způsob pro budoucí zkoumání populací lakušníků. Celkem se podařilo získat 12 lokusů pro *R. trichophyllus* A a 10 lokusů pro *R. trichophyllus* B, přičemž oba cytotypy sdílí 6 stejných lokusů, které byly pečlivě vybrány skrze 3 analýzy. Každý lokus obsahoval průměrně 3 alely. Z výsledků analýzy hlavních koordinát vyplývá, že mezipopulační variabilita je výrazně vyšší než variabilita uvnitř jednotlivých populací. Pro přesnější výsledky je potřeba vyvinuté markery vyzkoušet na více populacích.

Literatura

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2018): Molecular biology of the cell. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., – New York: Garland Science.
- Arrigo N., Bétrisey S., Graf L., Bilat J., Gerber E. & Kozłowski G. (2016): Hybridization as a threat in climate relict *Nuphar pumila* (Nymphaeaceae). – *Biodivers. Conserv.* 25: 1863–1877.
- Bhargava A. & Fuentes F. F. (2010): Mutational Dynamics of Microsatellites. – *Mol. Biotechnol.* 44: 250–266.
- Bricker E., Calladine A., Virnstein R. & Waycott M. (2018): Mega Clonality in an Aquatic Plant—A Potential Survival Strategy in a Changing Environment. – *Front. Plant Sci.* 9: 1–8.
- Dijk J. K. Van, Waycott M., Tussenbroek B. I. Van & Ouborg J. (2007): Polymorphic microsatellite markers for the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* Banks ex König. – *Mol. Ecol. Notes* 7: 89–91.
- Drag L., Košnar J. & Čížek L. (2013): Development and characterization of ten polymorphic microsatellite loci for the Great Capricorn beetle (*Cerambyx cerdo*) (Coleoptera: Cerambycidae). – *Conserv. Genet. Resour.* 5: 907–909.
- Duwe V. K., Ismail S. A., Buser A., Sossai E., Borsch T. & Muller L. A. H. (2015): Fourteen Polymorphic Microsatellite Markers for the Threatened *Arnica montana* (Asteraceae). – *Appl. Plant Sci.* 3: 1400091.
- Duwe V. K., Muller L. A. H., Borsch T. & Ismail S. A. (2017): Pervasive genetic differentiation among Central European populations of the threatened *Arnica montana* L. and genetic erosion at lower elevations. – *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*
- Ebrahimi A., Mathur S., Lawson S. S., LaBonte N. R., Lorch A., Coggeshall M. V. & Woeste K. E. (2019): Microsatellite Borders and Micro-sequence Conservation in Juglans. – *Sci. Rep.* 9: 3748.
- Englmaier P. (2016): *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. *Neilreichia.* 8: 97–125.

- Gemeinhardt H. S. (2019): Testing cross-amplification of microsatellites on European *Ranunculus* sect. *Batrachium* species Ms. [Bc. Thesis, depon in: Jihočeská univerzita, České Budějovice, Czech Republic].
- Greenough L., Schermerhorn K. M., Mazzola L., Bybee J., Rivizzigno D., Cantin E., Slatko B. E. & Gardner A. F. (2016): Adapting capillary gel electrophoresis as a sensitive, high-throughput method to accelerate characterization of nucleic acid metabolic enzymes. – *Nucleic Acids Res.* 44: e15.
- Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R. & Dhawan A. K. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. – *Euphytica* 177: 309–334.
- Karger B. L. & Guttman A. (2009): DNA sequencing by CE. – *Electrophoresis* 30: 196–202.
- Koutecký P. & Košnar J. (2018): *Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice* – Skripta, PřF JU, České Budějovice.
- Koutecký P., Prančl J., Košnar J., Koutecká E., Hanzlíčková J., Lučanová M., Nejedlá M. & Kaplan Z. (2022): Waking up from a taxonomist's nightmare: emerging structure of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae) in central Europe based on molecular data and genome sizes. – *Bot. J. Linn. Soc.* 198: 417–437.
- Kúr P., Košnar J. & Štech M. (2014): Characterization and cross-species amplification of 16 microsatellite loci in *Spergularia echinosperma* (Caryophyllales: Caryophyllaceae). – *Conserv. Genet. Resour.* 6: 571–573.
- Li Z. Z., Ngarega B. K., Lehtonen S., Gichira A. W., Karichu M. J., Wang Q. F. & Chen J. M. (2020): Cryptic diversity within the African aquatic plant *Ottelia ulvifolia* (Hydrocharitaceae) revealed by population genetic and phylogenetic analyses. – *J. Plant Res.* 133: 373–381.
- Mason A. S. (2015): SSR Genotyping. In *Plant Genotyping*, pp. 77–89.
- Mitchelson K. R. (2001): Overview: The Application of Capillary Electrophoresis for DNA Polymorphism Analysis. In *Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids*, pp. 3–26. – Humana Press, New Jersey.
- Mitchelson K. R. (2003): The Use of Capillary Electrophoresis for DNA Polymorphism Analysis. – *Mol. Biotechnol.* 24: 41–68.

- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R. & Vieira M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 294–307.
- Prančl J. (2015): Lakušníky – výkladní skříň evoluce skrytá v našich vodách. *Živa*. 1: 12–15.
- Prančl J., Koutecký P., Trávníček P., Jarolímová V., Lučanová M., Koutecká E. & Kaplan Z. (2018): Cytotype variation, cryptic diversity and hybridization in *Ranunculus* sect. *Batrachium* revealed by flow cytometry and chromosome numbers. – *Preslia* 90: 195–223.
- Remya K., Joseph S., Lakshmi P. & Akhila S. (2010): Microsatellites in varied arenas of research. – *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2: 141.
- Schuelke M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. – *Nat. Biotechnol.* 18: 233–234.
- Srivastava S., Avvaru A. K., Sowpati D. T. & Mishra R. K. (2019): Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. – *BMC Genomics* 20: 153.
- Trivedi S. (2004): Microsatellites (SSRs): Puzzles within puzzle. – *Indian J. Biotechnol.* 3: 331–347.
- Vieira M. L. C., Santini L., Diniz A. L. & Munhoz C. D. F. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. – *Genet. Mol. Biol.* 39: 312–328.
- Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., Losick R. & Harriossn S. C. (2014): Molecular biology of the gene. – *BMJ* 2: 1446–1447.
- Westermeier R. (2013): Gel Electrophoresis. In *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–6. – Nature Publishing Group, London.
- Wiegleb G., Bobrov A. A. & Zalewska-Gałosz J. (2017): A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae). – *Phytotaxa* 319: 1–55.
- Wu Z., Wu J., Wang Y. & Hou H. (2017): Development of EST-Derived Microsatellite Markers in the Aquatic Macrophyte *Ranunculus bungei* (Ranunculaceae). – *Appl. Plant Sci.* 5: 1700022.
- Wu Z., Xu X., Zhang J., Wiegleb G. & Hou H. (2019): Influence of environmental factors on the genetic variation of the aquatic macrophyte *Ranunculus subrigidus* on the Qinghai-Tibetan Plateau. – *BMC Evol. Biol.* 19: 228.