

Příloha č. 9

Závěrečná zpráva – genetické analýzy

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA

Tento dokument byl vytvořen za finanční podpory EHP fondů 2009-2014 a Ministerstva životního prostředí v rámci projektu **MGSII-23: „Příprava záchranného programu pro koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*)“**. Za obsah tohoto dokumentu je výhradně odpovědná Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a nelze jej v žádném případě považovat za názor donora nebo Ministerstva životního prostředí.

Analýza genetické variability koniklece otevřeného na vybraných lokalitách

Zpracovatel:

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i.

Jana Šedivá, Markéta Pospíšková

Analýza genetické variability koniklece otevřeného na vybraných lokalitách

1. Úvod

Koniklec otevřený (*Pulsatilla patens* (L.) Mill.) patří mezi kriticky ohrožený druh v České republice. Postupně vymizel z více jak 90 % lokalit. Koniklec otevřený je rozšířen v centrální a východní Evropě, se západním okrajem rozprostírajícím se u Švédska a Německa. Nejen u nás, ale téměř ve všech evropských zemích kromě Ukrajiny je považován za ohrožený druh. Je pod ochranou Bernské konvence vzhledem k malému množství lokalit, nízké četnosti a postupné ztrátě lokalit. Důvodem tohoto neutěšeného stavu je změna hospodaření v krajině, především absence požárů, ukončení pastvy dobytka a celková eutrofizace. Tyto změny způsobují zarůstání lokalit mechem a dominantními trávami, které zabraňují regeneraci koniklece (Procházka 2001, Turoňová et al. 2012).

Možným řešením je dlouhodobá ochrana a plány péče zacílené na záchranu cenných populací tohoto druhu. Což představuje na jedné straně enviromentální monitoring a na straně druhé stanovení genetické diverzity uvnitř a mezi populacemi. Obecně se předpokládá, že populace s vysokou genetickou diverzitou se lépe adaptují na měnící se prostředí a mají vyšší fitness.

Pro stanovení genetické variability se využívají analýzy DNA, kam patří i metoda mikrosatelitových lokusů (mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence DNA, jsou tvořeny 1-6 páry bází a počet repetitivních jednotlivých motivů se může pohybovat až ve stovkách) neboli SSR markerů, které se hojně využívají pro ekologické studie.

SSR markery byly popsány u dvou druhů koniklece, a to pro *P. patens* (Szczecińska et al. 2013) a *P. vulgaris* (DiLeo et al. 2015).

Cílem projektu bylo vyhodnocení genetické variability pomocí SSR markerů u 4–5 vybraných populací koniklece otevřeného, celkem u 120 jedinců. Analýza genetické variability *P. patens* byla realizována partnerem projektu (VÚKOZ, v.v.i. Průhonice).

2. Materiál a metoda

Schéma pokusů

V rámci grantu byly realizovány tyto experimenty:

1. Výběr izolačního kitu, testování a výběr SSR primerů navržených pro *P. patens* (předběžné pokusy) a vlastní analýza jedinců z šesti vybraných lokalit (Experiment I.),
2. testování a optimalizace podmínek PCR (Experiment II.),
3. testování a výběr primerů navržených pro *P. vulgaris* a vlastní analýza jedinců z několika vybraných lokalit (Experiment III.).

Rostlinný materiál

Vzorky byly odebrány ze 6 lokalit (Tab. 1). Následně byly usušeny a byla provedena izolace DNA.

Název lokality	Území	Zkratka	Přibližný počet rostlin/lokalitě	Počet odebraných vzorků
1.Krásná Lípa	Krušné hory	KL	80	28
2.Zvoníček	Doupovské hory	ZV	150–200	30
3.Dubový vrch	Doupovské hory	DV	1000 (4 mikrolokality), kříženci	30 (3× <i>P. pratensis</i> + 2×kříženci)
4.Jindřichova skála	Jestřebsko-Dokesko	JS	80	30
5.Holý vrch	České Středohoří	HV	250	31
6.Bělá pod Bezdězem		BB	10	8 (3 (1× <i>P. pratensis</i> + 2×kříženci))
Celkem				160

Tab. 1: Přehled vybraných lokalit *P. patens* zahrnutých pro DNA analýzy

Příprava vzorků

V předběžných pokusech byly pro analýzy použity rostlinky *P. patens*, které pocházely ze sterilních *in vitro* kultur. V dalších experimentech (I.–III.) byl použit rostlinný materiál z vybraných lokalit. Při odběru vzorků z lokalit byly listy ihned uloženy do mikrotenových sáčků. Během transportu vzorků z lokalit do laboratoře byly uchovány v mobilní chladničce. Vzorky byly odebrány ve dvou termínech, a to v polovině června a srpna. Rostlinný materiál byl krátkodobě uchován v ledničce (1–2 dny) při teplotě +4 °C, a pak byly listy (1–2) vloženy do mikrozkupek a lyofilizovány. Vlastní lyofilizace probíhala tak, že mikrozkupek se vzorky (s otvory) byly ponořeny do nádoby s tekutým dusíkem a ihned vloženy do lyofilizátoru (Heto Dry Winner). Vzorky byly sušeny pět hodin ve vakuu. Poté byly mikrozkupek utěsněny parafilmem a uloženy do papírových krabiček. Takto upravené vzorky se skladovaly při pokojové teplotě. Výhodou lyofilizace je možnost dlouhodobého skladování vzorků, aniž by došlo k jejich následné degradaci.

Izolace DNA

Z každého usušeného vzorku bylo odebráno 40 mg listů. Do mikrozkupek se ke vzorku přidaly tři skleněné kuličky a vzorky se mechanicky rozdrtily v mlýnku (Retsch). V předběžných pokusech byly testovány dva komerční izolační kity: 1. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) a 2. Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Izolace zahrnovala několik kroků: mechanické rozrušení pletiva, rozklad buněk (lýze) ve speciálním pufru a enzymu při 65 °C, vyčištění lyzátu na kolonce, navázání DNA na kolonku, několikeré promývání DNA od nečistot pomocí speciálních pufrů. Posledním krokem izolace bylo rozpuštění DNA z kolonky pomocí vymývacího (elučního) pufru. Od každého vzorku jsme získaly 100 µl DNA, která byla uložena v mikrozkupekách při +4 °C. Stanovení koncentrace izolované DNA byla provedena na spektrofotometru (NanoDrop 2000), nanesením 2 µl vzorku na snímací čidlo přístroje a porovnáním s kontrolou o známé koncentraci. Koncentrace DNA byla stanovena při absorbanci 260 nm, čistota DNA z poměrů absorbancí při 260 nm a 280 nm.

Amplifikace mikrosatelitových lokusů

Sekvence DNA v oblastech mikrosatelitu je třeba namnožit, aby bylo možné je vzájemně porovnat podle velikosti. K tomu slouží polymerázová řetězová reakce (PCR). Primery pro amplifikaci mikrosatelitových oblastí pro *P. patens* byly převzaty z literatury, neboť vývoj nových primerů je časově a finančně velmi náročný. Použité SSR markery byly navrženy pro *P. patens* (Szczeńska et al. 2013). Podmínky amplifikace, PCR a elektroforézy byly provedeny podle Szczeńska et al. (2012).

Reakční směs pro PCR (20 µl) obsahovala genomovou DNA jedince, termostabilní DNA polymerázu, směs nukleotidů dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a primery. V průběhu každého cyklu (celkem 35 cyklů) dochází při změně teploty v termocykleru postupně k denaturaci DNA, nasedání primerů a prodlužování nových řetězců DNA. PCR reakce probíhala v termocykleru GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). PCR je metoda citlivá na kontaminaci, proto byla provedena negativní kontrola PCR, kdy do jedné ze zkumavek se přidala místo templátu sterilní ultračistá voda. V předpokusech bylo testováno dvanáct SSR markerů pro *P. patens* (Pul01–Pul12), v Experimentu I. bylo dále použito osm SSR markerů Pul01, Pul03, Pul05, Pul06, Pul07, Pul09, Pul10, Pul11). V Experimentu III. bylo testováno osm SSR markerů (PV2, PV7, PV9, PV16, PV32, PV52, PV 56, PV64 a PV65) pro *P. vulgaris* a dále použito šest markerů (PV2, PV7, PV9, PV32, PV52, PV 56, a PV65).

Pro optimalizaci PCR reakce jsme se zaměřily na teplotní a časový profil reakce, porovnání kvality polymerázy (PCRBIO Taq DNA Polymerase, firma PCRBiosystems a Thermo Scientific DreamTaq DNA POLYMERASE, firma Thermo Fisher Scientific) od dvou výrobců a změnu koncentrace jednotlivých komponent reakční směsi (polymerázy, nukleotidů a DNA koniklece).

Elektroforetické dělení fragmentů na gelu

Vlastní dělení fragmentů po PCR bylo provedeno na polyakrylamidovém gelu. Vzhledem k tomu, že pentózofosfátová kostra všech nukleových kyselin nese stejně velký záporný náboj, migrují fragmenty v elektrickém poli vždy k anodě a rychlost migrace je závislá na jejich velikosti. Kratší fragmenty putují rychleji než fragmenty delší. Koncentrace gelu je navrhována podle velikosti dělených fragmentů.

Pro dělení fragmentů PCR *P. patens* byl použit 6% polyakrylamidový gel, barvený stříbrem, který dovolil oddělit fragmenty lišící se o 2 báze. Gel byl po skončení elektroforézy obarven, pak přenesen do vyvíjecího roztoku až po objevení proužků a nakonec byla provedena fixace proužků ve fixačním roztoku. Gel byl vysušen při pokojové teplotě a vyfocen v temné komoře za použití speciálního fotografického papíru (Automatic Processor Compatible Film, Promega), vyvíjecího roztoku a ustalovače od firmy Sigma.

Hodnocení

Velikost fragmentů se zjišťuje porovnáním s velikostním standardem, kterým je osekvenovaný vektor o známé sekvenci a velikosti [pGEM®-3Zf(+)] control DNA (Promega)]. Ten se nanáší při elektroforéze na gel společně se vzorky. Námi užívaná metoda dovoluje oddělit a určit fragmenty lišící se o 2 báze, u dinukleotidových mikrosatelitů tedy o 1 opakuje se jednotku.

3. Výsledky

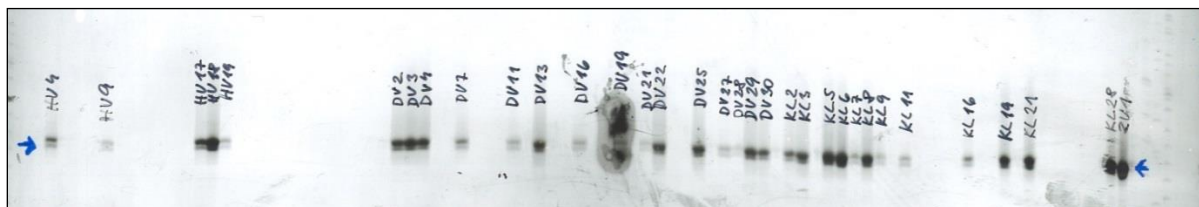
V období řešení projektu (5/2015–3/2016) ze strany partnera (VÚKOZ, v.v.i.) byly provedeny genetické analýzy u 160 vzorků včetně kříženců *Pulsatilla* × *hackelii* (*P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica*). Vzorky pocházely ze 6 lokalit (Dubový vrch – DV, Krásná Lípa – KL, Jindřichova skála – JS, Holý vrch – HV, Bělá pod Bezdězem – BB a Zvoníčkov – ZV).

Experiment I.

V předpokusech byly testovány dva izolační kity DNeasy Plant Mini Kit a Invisorb Spin Plant Mini Kit. Byl vybrán Invisorb Spin Plant Mini Kit od firmy Invitex, neboť izolace byla snadnější, levnější a kvalita vyizolované DNA byla srovnatelná s Qiagenem. Bylo zjištěno, že termín odběru vzorků měl významný vliv na výtěžnost DNA. Vzorky, které byly odebrány v červnu obsahovaly dvojnásobné množství DNA (ø 333 ng/μl/vzorek) v porovnání s odběrem v srpnu (ø 155 ng/μl/vzorek). Navíc u vzorků odebraných v pozdějším termínu se objevovaly vzorky s částečnou nektrózou (např. HV). Podle výsledků které jsme získaly je patrné, že fyziologický stav má vliv na množství vyizolované DNA.

Dalším cílem byl užší výběr SSR markerů (pro *P. patens*). Bylo testováno dvanáct SSR markerů a osm nejlepších bylo použito pro další pokusy. V této fázi pokusů byla vyizolovaná DNA použita z *in vitro* kultur, amplifikace, PCR a elektroforéza byly provedeny přesně podle Szczecińska et al. (2012).

Po užším výběru SSR markerů byly analyzovány jedinci ze 6 lokalit. I když bylo postupováno podle výše uvedených metodik, nebyla zaznamenána žádná variabilita mezi vzorky ani v rámci populací ani mezi populacemi (Obr. 1).



Obr. 1: Výsledky elektroforetického dělení produktů PCR na polyakrylovém gelu u vzorků z lokality HV, DV, KL a ZV s použitím SSR markeru Pul06, viz modré šipky monomorfní vzorky (shodné alely u všech vzorků).

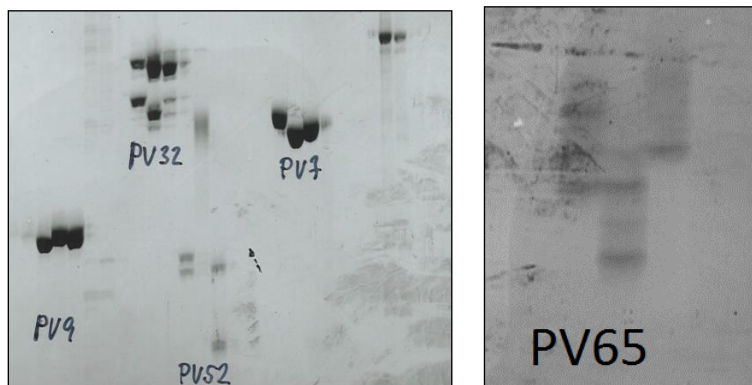
Podle výsledků, které byly dosaženy lze konstatovat, že použitou metodiku nelze použít ve stávající formě pro námi zvolené cíle. Vzhledem k nefunkčnosti této metodiky jsme hledaly alternativní řešení, kontaktovaly jsme autory metodiky (Szczecińska 2013) a dle jejich doporučení upravily podmínky PCR a rovněž se zaměřily na testování dalších primerů.

Experiment II.

V druhé sadě experimentů byly analýzy zaměřeny na změnu podmínek PCR viz Materiál a metoda. Experimenty byly provedeny se čtyřmi vzorky (po jednom vzorku z lokalit DV, KL, HV a ZV) pro všech dvanáct markerů popsanych v článku (Szczecińska et al. 2013). I když jsme se zaměřily na několik aspektů PCR reakce a otestovaly jsme různé PCR reakce, lepších výsledků jsme nedosáhly.

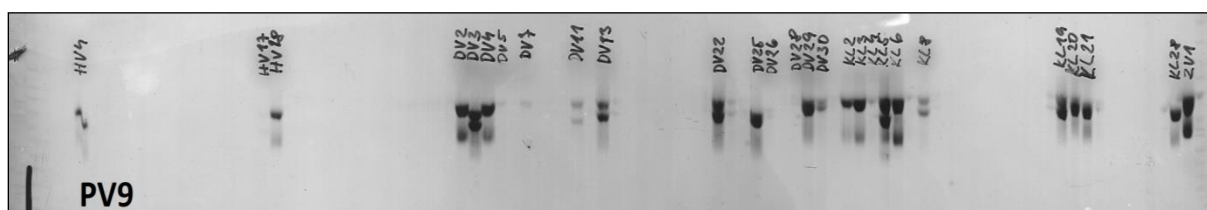
Experiment III.

Dílečho úspěchu bylo zaznamenáno až s použitím nových markerů navržených pro *P. vulgaris* (Dileo et al. 2015). Otestováno bylo osm markerů, z toho bylo vhodných šest markerů. Každý marker byl zkoušen na třech vzorcích (2 × DV, 1 × KL). Byla prokázána heterozygotnost jednotlivých markerů, počet alel se pohyboval od 1–5. Mezi nejlepší patřily markery PV32 – 4 alely, PV52 – 5 alel, PV 65 – 4 alely (Obr. 2).

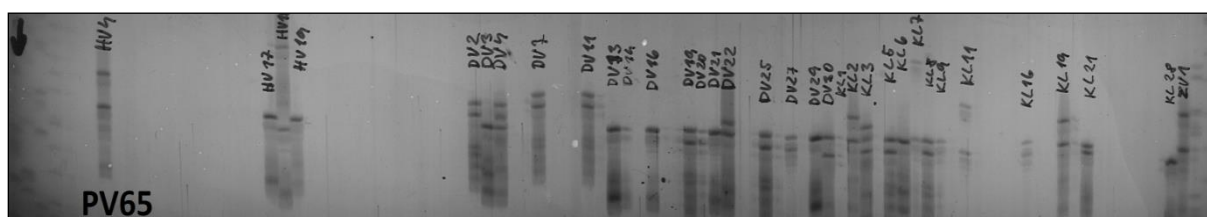


Obr. 2: Výsledky testování mikrosatelitových markerů pro *P. vulgaris* u 3 vzorků *P. patens*, vzorky jsou polymorfni (odlišné alely u jednotlivých vzorků).

Dva markery (PV09 a PV65) byly aplikovány na 90 vzorků ze čtyř lokalit (HV, DV, KL a ZV). U PV09 se amplifikovalo 27 vzorků u PV65 34 vzorků (Obr. 3, 4).

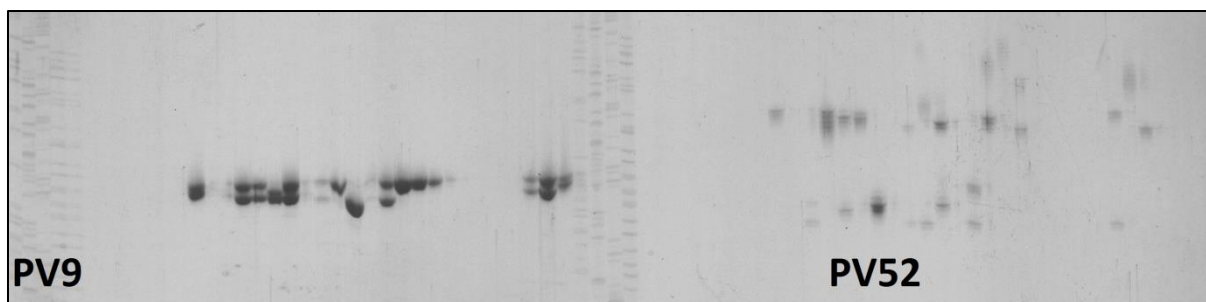


Obr. 3: Výsledky elektroforetického dělení produktů PCR na polyakrylovém gelu u vzorků z lokalit HV, DV, KL a ZV s použitím SSR markeru PV9, vzorky jsou polymorfni (odlišné alely u jednotlivých vzorků).



Obr. 4: Výsledky elektroforetického dělení produktů PCR na polyakrylovém gelu u vzorků z lokalit HV, DV, KL a ZV s použitím SSR markeru PV65, vzorky jsou polymorfni (odlišné alely u jednotlivých vzorků).

Vhodnost vybraných markerů se prokázala u předběžné analýzy populace Zvoníček, kdy byly testovány dva markery: PV9, kde byly zaznamenány 3 alely a PV52, kde bylo zaznamenáno devět alel (Obr. 5).



Obr. 5: Výsledky elektroforetického dělení produktů PCR na polyakrylovém gelu u vzorků z lokality ZV s použitím SSR markeru PV9 a PV52 (vysoce polymorfní), vzorky jsou polymorfní (odlišné alely u jednotlivých vzorků).

4. Diskuze a závěr

Objem naplánovaných analýz DNA pomocí SSR markerů byl v rámci projektu splněn, avšak SSR analýza nezjistila variabilitu ani mezi vzorky v rámci jednotlivých populací ani mezi populacemi. Tento výsledek mohl být zapříčiněn:

- a) nízkou genetickou variabilitou českých populací koniklece otevřeného
- b) nevhodností polských primerů pro českou populaci koniklece
- c) malým množstvím analyzované DNA

Pro zjištění příčiny byly upraveny podmínky PCR reakce, aby bylo získáno větší množství DNA. Spojily jsme se s autory metodiky z Polska (Szczecińska 2013) a diskutovaly jsme s nimi naše výsledky a metodické postupy. Po upravení podmínek PCR však nebyla opět nalezena variabilita mezi hodnocenými vzorky.

Jedním z důvodů může být genetická odlišnost lokalit v Polsku. Szczecińska (e-mailová komunikace) poukazuje na nízkou genetickou diverzitu mnoha polských lokalit *P. patens*, počet alel se pohyboval pouze kolem dvou až třech.

Pro hodnocení genetické diverzity *P. patens* v rámci a mezi populacemi je stěžejní stupeň amplifikace (existence namnoženého produktu pomocí PCR). Při našich experimentech jsme zjistily, že výtěžnost DNA byla dvakrát nižší při pozdějším odběru v srpnu v porovnání s červnem. Domníváme se, že pozdější odběr vzorků měl také negativní vliv na kvalitu DNA. Bylo zjištěno, že u vzorků, které byly odebrány v červnu dosahovala amplifikace produktů po PCR na gelu kolem 50 %, zatímco u vzorků při odběru v srpnu byla amplifikace pouze 15 %. Naplánovaný odběr vzorků byl v projektu od dubna do července, vzhledem k posunu začátku projektu se odběry v jarních měsících nemohly uskutečnit. U některých vzorků amplifikace neproběhla ani po opakované izolaci DNA. Protože podíl takových vzorků byl vyšší u populací, kde byl rostlinný materiál odebírán v pozdějším termínu, domníváme se, že kvalita izolované DNA u koniklece významně závisí na stáří listu. Listy je tedy třeba odebírat co nejdříve.

Szczecińska poukazovala také na důležitost optimalizovat podmínky PCR. I když bylo změněno několik faktorů (např. teplota a koncentrace komponent), amplifikace se nezlepšila.

Vzhledem k nevhodnosti SSR markerů pro *P. patens* byly otestovány SSR markery pro *P. vulgaris* podle Dileo et al. (2015), které ukazují slibné výsledky. V předběžných pokusech bylo otestováno 8 primerů, z toho bylo 6 vhodných pro studovaný druh. Každý primer byl úspěšně zkoušen na 3 vzorcích a byla prokázána heterozygotnost jednotlivých markerů, počet

alel se pohyboval od 1–5. V případě, kdy se analyzovalo více vzorků z lokality Zvoníček, byl počet alel vyšší, dosahoval až 9 alel u markeru PV52, kde se objevily odlišné alely u jednotlivých vzorků. Tento marker vzhledem k vyššímu počtu alel může odhalit odlišnosti jak v rámci populace, tak mezi jednotlivými populacemi. Čím více alel, tím je vyšší pravděpodobnost odhalení genetické variability u jednotlivých vzorků.

Provedená analýza nepřinesla informace o genetické variabilitě předmětného druhu. Příčinou toho byly komplikace metodického rázu, které však byly obtížně předvídatelné, neboť:

- a) byl použit metodický postup používaný na všech vědeckých pracovištích
- b) pro analýzu byly využity jediné publikované informace o primerech pro tento druh
- c) primery byly testovány na vzorcích z *in vitro* kultur (vzhledem k ohroženosti studovaného druhu nebylo možné provést testování na vzorcích z přirozených populací)

Při hledání jiného metodického postupu k získání požadovaných výsledků byly testovány primery publikované pro jiný druh koniklece. Z výsledků testování je možné předpokládat, že amplifikace DNA pomocí testovaných primerů a následná analýza SSR by již přinesla informace o genetické variabilitě koniklece otevřeného v ČR. Tato analýza bude zařazena jako jedno z opatření do připravovaného Záchraného programu pro koniklece otevřený. Pro pokračování DNA analýz bude nezbytný odběr vzorků v jarních měsících, aby nedošlo k degradaci DNA v listech.

Literatura

- DiLeo M. F., Graf R., Holderegger R., Rico Y., Wagner H. H. (2015): Highly Polymorphic Microsatellite markers in *Pulsatilla vulgaris* (Ranunculaceae) using next-generation sequencing. Applications in Plant Sciences 3:7.
- Procházka F. (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). – Příroda, 18: 1–166.
- Szczecińska M., Kwasniewski M., Chwiałkowska K., Sawicki J. (2013): Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pulsatilla patens* (L.) Mill. (Ranunculaceae) a rare and endangered plant species in Europe. Conservation Genet. Resour. 5:421–423.
- Szczecińska M., Kwasniewski M., Sawicki J., Szandar K., Pisarek W. (2012): Development of microsatellite markers using pyrosequencing in *Galium trifidum* (Rubiaceae), a rare species in central Europe. Int J Mol Sci. 13(8): 9893–9899.
- Turoňová D., Hamerský R., Ondráček Č. (2012): Koniklece otevřený – mírně optimistická zpráva o stavu druhu Současný stav populací a jejich management. Ochrana přírody 5:18 – 20.