

Příloha 1.

MGSII-17 Záchranný program pro zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

Studie genetické variability

Závěrečná zpráva

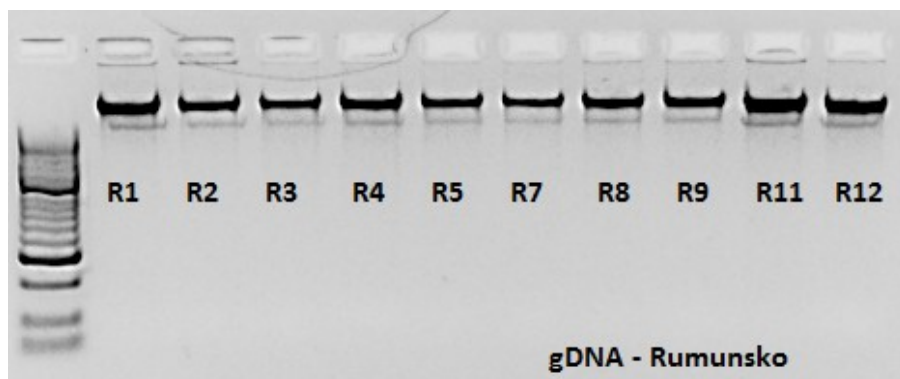
a) Materiál

Pro posouzení současného stavu genetické variability a příbuznosti populací, které se vyskytují na území ČR s populacemi v sousedních státech, bylo analyzováno celkem 93 vzorků *A. liliifolia* z 23 lokalit pocházejících z pěti Evropských států (Česká republika, Slovensko, Polsko, Maďarsko, Rumunsko), viz Tabulka 1. Vzorky byly dodány v sušeném stavu v plastových sáčkách se silikagelem.

b) Použité metody

Extrakce DNA

Extrakce DNA byla provedena podle standartního CTAB protokolu (Doyle & Doyle 1987) používaného v Laboratoři molekulárních markerů Katedry botaniky PŘF UP v Olomouci. Koncentrace DNA byla změřena na UV-spektrofotometru Nanodrop 2000. Po naředění DNA na koncentraci $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byly vzorky uloženy v hlubokomrazícím boxu (-80°C). Integrita vyizolované DNA byla ověřena na 1,5% agarozovém gelu (Obr. 1).



Obr. 1. Ukázka výsledků agarózové elektroforézy se vzorky vyizolované DNA

AFLP

Na několika vzorcích bylo provedeno testování funkčnosti metody AFLP na DNA vyizolované pro tuto studii. Zároveň byl proveden výběr primerových kombinací, které byly použity pro analýzu celého datasetu. Finální analýzy byly provedeny pomocí osmi primerových kombinací (Tabulka 2). Protokol

Příloha 1.

použitý pro provedení metody AFLP na studovaném souboru vzorků byl upraven podle publikace Vos et al. (1995) s dílčími modifikacemi. Genomická DNA byla štěpena pomocí enzymů *EcoRI* a *MseI* v celkovém objemu 20 μ l; následně byla provedena ligace *EcoRI* a *MseI* adapterů k fragmentům DNA získaných v předchozím kroku. Preamplifikace takto získaných konjugátů byla provedena v 20 μ l objemu PCR mastermixu. PCR podmínky preamplifikace : 94°C – 3:00; 20 cyklů 94°C (30s), 56°C (60s), 72°C – (1:45); 72°C – 5:00. Preamplifikát DNA byl zředěn v poměru 1:7 a použit jako templát selektivní amplifikace pomocí osmi primerových kombinací uvedených v Tabulce 2. PCR podmínky amplifikace: denaturace 95°C (4:30); 20 cyklů 95°C (30 s), annealing 60,1°C (30 s), extenze 72°C (60 s); následně 1 cyklus s annealingovou teplotou 56°C. Amplifikované fragmenty byly denaturovány pomocí denaturačního nanášecího pufru (98% formamid, bromfenolová modř) zahřátím na 95°C (3 min). Separace vzorků byla provedena na 6% denaturačním polyakrylamidovém gelu s následnou vizualizací fragmentů barvením stříbrem.

Analýza dat

AFLP fragmenty byly hodnoceny vizuálně, a to pouze bandy spolehlivě rozlišitelné a detekovatelné. Na základě takto získaných dat (1 = přítomnost, 0 = nepřítomnost bandu) byla v programu MS Excel vytvořena binární matice, která byla dále použita pro další analýzy. Pro vizualizaci genetické příbuznosti analyzovaných položek byly použity dva přístupy: a) formou Neighbor-joining dendrogramu (Diceův koeficient podobnosti, 1000 bootstrap replikací) pomocí software FreeTree a FigTree (Pavliček et al. 1999, FigTree 2015); b) Bayesovským clusterováním (STRUCTURE 2.2, Falush et al. 2007).

Z důvodu malého počtu jedinců představujících některé populace (viz Tab. 1) byly statistické výpočty prováděny na úrovni států (tj. níže uvedené indexy se vztahují ke skupině vzorků, pocházejících ze stejného státu). Pro posouzení genetické diverzity byly vypočítány indexy heterozygotnosti (H_E), polymorfismus (P%) (GENALEX 6 software, Peakall & Smouse 2006), počet privátních bandů (N_{PB} ; markery přítomné pouze u jedinců určité skupiny vzorků, nemusí se nacházet u všech jedinců dané skupiny/populace) a počet privátních fixovaných bandů (N_{FPB} ; markery unikátní pro danou skupinu/populaci, které byly nalezeny u všech jedinců skupiny/populace) (FAMD 1.31, Schlüter and Harris 2006). Zatímco indexy P a H_E vypovídají o celkové variabilitě souboru, indexy N_{PB} a N_{FPB} ukazují na možnou izolovanost hodnocených skupin/populací. Výpočet celkové genetické variability byl proveden v programu AFLP-SURV 1.0. Pro výpočet fixačního indexu (F_{ST}), a analýzy molekulární variance (AMOVA) byl použit program ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) pro posouzení distribuce celkové genetické variability uvnitř a mezi hodnocenými skupinami vzorků/populací. Hodnoty F_{ST} se pohybují v rozmezí 0-1, přičemž hodnoty blízké 0 ukazují na vysokou podobnost

Příloha 1.

populací danou vysokým počtem sdílených alel. Pro kompletně izolované populace se hodnota F_{ST} blíží 1 (nemají žádné společné alely).

c) Výsledky

Z celkem 93 analyzovaných vzorků bylo 9 vzorků z dalšího hodnocení vyloučeno, protože u nich neproběhla amplifikace. Výsledky studie jsou tedy založeny na hodnocení 84 jedinců *A. liliifolia*, které byly analyzovány pomocí osmi AFLP primerových kombinací (Tabulky 1 a 2). Celkem bylo detekováno 291 bandů, z nichž bylo 242 polymorfních (83.2% informativních markerů).

Tabulka 1. Seznam analyzovaných vzorků s výsledky statistických analýz (n, počet vzorků; n.a., neanalyzováno; N_{PB} , počet privátních bandů; N_{FPB} , počet fixovaných privátních bandů; P%, polymorfismus; H_E , očekávaná heterozygotnost; SE, směrodatná odchylka)

| Stát/lokalita | označení | n | N_{PB} | N_{FPB} | P% | H_E (SE) |
|----------------------------------|----------|----|----------|-----------|-------|---------------|
| Slovensko (prům. hodnoty) | | 29 | 14 | 0 | 68.73 | 0.138 (0.009) |
| Silica | 01 – 04 | 4 | 1 | 1 | 20.62 | 0.069 (0.009) |
| Pusté pole (západ) | 05 – 07 | 3 | 0 | 0 | 18.90 | 0.072 (0.009) |
| Pusté pole (východ) | 08 – 10 | 3 | 0 | 0 | 26.46 | 0.097 (0.010) |
| Michalovo | 11 – 15 | 5 | 0 | 0 | 30.24 | 0.088 (0.009) |
| Cigánka | 16 – 20 | 5 | 0 | 0 | 29.55 | 0.093 (0.009) |
| Trsteník | 21 – 23 | 3 | 0 | 0 | 20.62 | 0.075 (0.009) |
| Kopanec | 24 – 26 | 3 | 0 | 0 | 25.43 | 0.093 (0.010) |
| Suchá Belá | 27 – 29 | 3 | 0 | 0 | 29.55 | 0.107 (0.010) |
| Polsko (prům. hodnoty) | | 6 | 0 | 0 | 38.49 | 0.105 (0.009) |
| Dabrowa | 30 | 1 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| Kisielany | 31 – 35 | 5 | 0 | 0 | 36.08 | 0.107 (0.009) |
| Česká republika (průměr) | | 18 | 2 | 0 | 56.01 | 0.118 (0.009) |
| Vražba | 36 – 40 | 5 | 2 | 0 | 32.30 | 0.099 (0.009) |
| Bilichovské údolí | 41 – 44 | 4 | 0 | 0 | 25.9 | 0.086 (0.009) |
| Karlické údolí | 45, 46 | 2 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| Karlštejn | 47 – 49 | 3 | 0 | 0 | 17.53 | 0.073 (0.009) |
| Babinské louky | 50 – 53 | 4 | 0 | 0 | 28.18 | 0.092 (0.009) |
| Maďarsko (průměr) | | 21 | 5 | 0 | 64.26 | 0.140 (0.009) |
| Aggtelek | 54 | 1 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| Fuzer: Drahos | 55 – 59 | 5 | 0 | 0 | 27.15 | 0.099 (0.010) |
| Regec: Gyertyan-kut-ret | 60 – 64 | 5 | 0 | 0 | 37.11 | 0.114 (0.010) |
| Kiskoros: Szucsierdo | 65 – 69 | 5 | 0 | 0 | 31.62 | 0.095 (0.009) |
| Dabas: Vizes-nyilas | 70, 71 | 2 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| Ocsa: Irtasok | 72 – 74 | 3 | 0 | 0 | 23.2 | 0.080 (0.009) |
| Rumunsko (průměr) | | 10 | 1 | 0 | 48.11 | 0.111 (0.009) |
| Prejmer | 75 – 79 | 5 | 0 | 0 | 31.96 | 0.095 (0.009) |
| Herculian | 80 – 84 | 5 | 0 | 0 | 34.71 | 0.099 (0.009) |
| průměr | | 84 | n.a. | n.a. | 55.12 | 0.122 (0.009) |

Příloha 1.

Tabulka 2. Použité primerové kombinace pro preselektivní a selektivní amplifikaci, sekvence použitých primerů a základní statistika počtu detekovaných (N_B) a polymorfních bandů (N_{PB}) pro danou kombinaci.

| Primerové kombinace pro selektivní amplifikaci | | N_B | N_{PB} |
|---|---|---------------------------------------|----------|
| Set A | EcoRI primer E-GG / MseI primer M-AAC | 41 | 31 |
| Set B | EcoRI primer E-CC / MseI primer M-AAC | 43 | 38 |
| Set C | EcoRI primer E-CC / MseI primer M-AAT | 49 | 44 |
| Set D | EcoRI primer E-CG / MseI primer M-AAC | 35 | 29 |
| Set E | EcoRI primer E-CG / MseI primer M-AAT | 42 | 36 |
| Set F | EcoRI primer E-TCG / MseI primer M-AACG | 22 | 17 |
| Set G | EcoRI primer E-TCC / MseI primer M-AACG | 26 | 20 |
| Set H | EcoRI primer E-TC / MseI primer M-AACCG | 33 | 27 |
| Sekvence primerů použitých pro preselektivní amplifikaci: | | | |
| EcoRI 5' – G ACT GCG TAC CAA TTC A –3' | | MseI 5' – G ATG AGT CCT GAG TAA C –3' | |

Základní indexy genetické variability

Nejvyšší hodnoty polymorfismu a očekávané heterozygotnosti byly nalezeny u skupiny vzorků ze Slovenska ($P=68.7\%$; $H_E=0.138$) a Maďarska ($P=64.2\%$; $H_E=0.140$), naopak nejnižší hodnoty byly pozorovány u vzorků z Polska ($P=38.4\%$; $H_E=0.105$) (Tab. 1). Kromě hodnocení na úrovni vyšších geografických celků – států, bylo provedeno hodnocení i na úrovni populací. Počty vzorků z jednotlivých populací se lišily a u některých populací byly příliš nízké, což může mít ve výsledku vliv na zjištěné hodnoty genetické variability. Na úrovni populací byly nejnižší hodnoty zjištěny u populace Karlštejn kde je popisován úbytek jedinců, podobně jako u lokality Silica (SK). Na druhé straně nejvyšší hodnoty byly zjištěny u lokalit z Rumunska, lokality Regec z Maďarska a lokality Kieselany (Polsko), kde je udáván nejvyšší počet jedinců na lokalitu (ca 1000).

Pro hodnocení rozdělení celkové genetické variability na variabilitu představovanou rozdíly mezi jedinci uvnitř populací a podílu variability na úrovni populací jako takových, byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA). Výsledek ukazuje, že celková hodnota genetické variability ($H_t = 0.158$) představuje z 92% rozdíly mezi jedinci uvnitř populací/skupin, zatímco pouze 8% variability představují vzájemné rozdíly mezi populacemi/skupinami. Hodnota fixačního indexu byla nízká ($F_{ST} =$

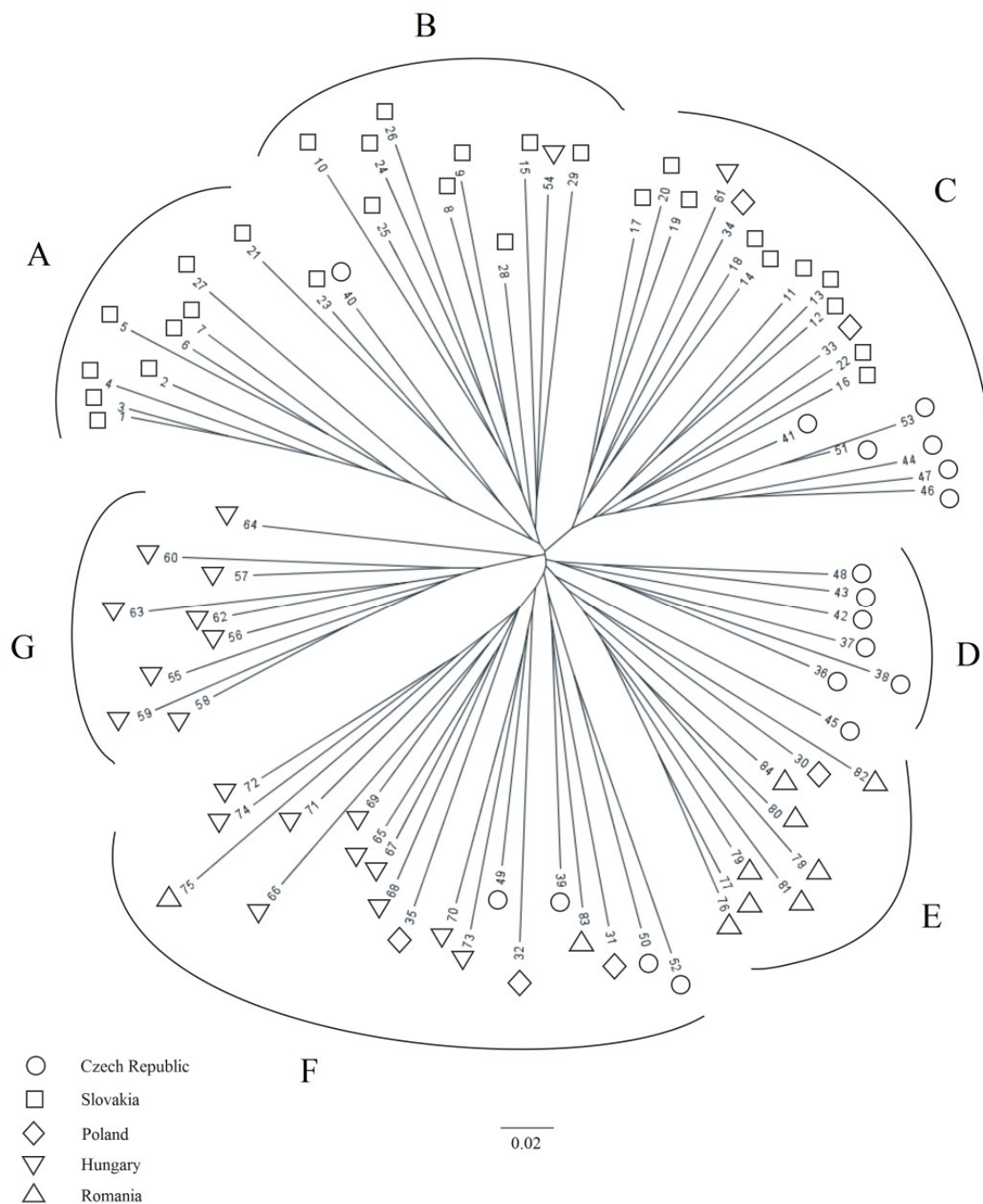
Příloha 1.

0.081) a ukazuje na malé rozdíly ve frekvenci alel mezi jednotlivými státy. Tyto hodnoty byly získány při rozdělení analyzovaných jedinců do skupin na úrovni států. Pokud provedeme modifikaci výpočtů, kdy v rámci států hodnotíme i variabilitu ve skutečných populacích (zastoupené ale nízkým počtem vzorků), pak stále velmi vysoký podíl variability (77.5%) představuje vnitropopulační variabilita, 4.1% představují rozdíly mezi státy a zbylých 18.4% představují rozdíly mezi populacemi uvnitř států (hodnota celkové genetické variability $H_t = 0.139$; $F_{ST} = 0.225$).

S výjimkou Slovenska nebyly na úrovni států ani populací detekovány privátní ani privátní fixované bandy. U skupiny vzorků ze Slovenska bylo detekováno 14 privátních bandů, přičemž u vzorků z lokality Silica byl detekován jeden privátní fixovaný band.

Populačně genetická struktura

Vizualizace vzájemných vztahů mezi analyzovanými vzorky ve formě Neighbor-Joining (NJ) dendrogramu rozdělila dataset do sedmi hlavních skupin (A-G; Obr. 2). Ačkoliv rozdělení vzorků do skupin není striktně spojeno s místem jejich geografického původu a není podpořeno výsledky bootstrapové analýzy, vztah mezi původem vzorků a pozici ve skupinách A-G lze nalézt. Všechny vzorky ze Slovenska se vyskytují ve skupinách A-C, přičemž do skupiny **A** spadají pouze vzorky ze Středního Slovenska a lokality Silica. Ve skupině **B** jsou kromě vzorků ze Slovenských lokalit i dva odlehlé vzorky z Maďarska (skupina **B**, po jednom vzorku z lokalit Aggtelek a Regec). Sedm vzorků z ČR a dva vzorky z Polska tvoří skupinu **C**, společně se vzorky z lokalit Michalovo a Cigánka. Zbylé vzorky z ČR jsou rozděleny do několika skupin: šest vzorků tvoří samostatnou větev **D**; do skupiny **E** s převahou vzorků z Rumunska spadá jeden vzorek; a konečně zbylé čtyři vzorky z ČR spadají do skupiny **F**, kde se shlukují vzorky z jižní části Maďarska, dva z Rumunska a dva z Polska. Poslední skupina **G** je tvořena pouze vzorky ze severu Maďarska (Fuzer, Regec).



Obr. 2. Neighbour-joining dendrogram vygenerovaný pomocí 291 AFLP markerů na souboru 84 vzorků *Adenophora liliifolia* z pěti Evropských států.

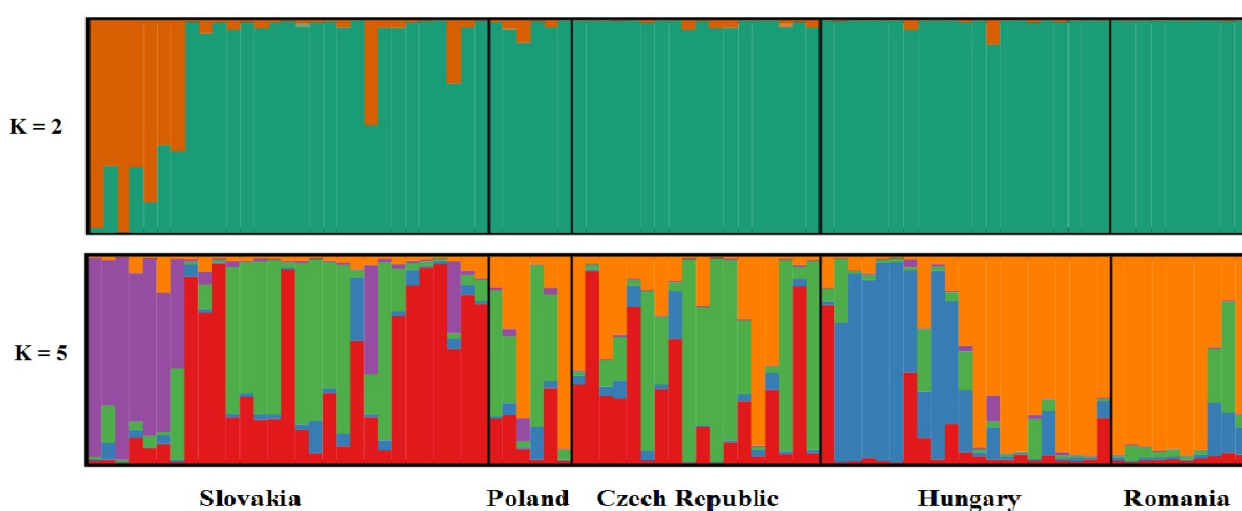
Při Bayesovském hodnocení vztahů mezi jednotlivými populacemi nedošlo k diferenciaci vzorků do jasně vyčleněných skupin podle vyšších geografických celků, což je zřejmé i z dendrogramu (Obr. 2 a 3). Programem STRUCTURE byly navrženy jako nejvíc pravděpodobné dva způsoby rozdělení vzorků, a

Příloha 1.

to do dvou ($K = 2$) nebo pěti ($K = 5$) skupin (max. hodnota $\Delta K = 57.627$ pro $K = 2$ a $\Delta K = 16.419$ pro $K = 5$) (Obr. 3).

Diagram pro $K = 2$ demonstruje celkově vysokou podobnost analyzovaných vzorků a současně určitou odlišnost Slovenských populací Silica (Slovenský kras) a Pusté pole (západ) (Obr. 3; levá strana diagramu barevně odlišená od převažující zelené barvy).

Rozdělení do pěti skupin ($K = 5$, Obr. 3) prakticky odráží rozdělení vzorků na NJ dendrogramu: i) skupina vzorků ze Slovenska (odpovídá skupině A na NJ dendrogramu: $\sim NJ^{\text{Group A}}$); ii) zbývající vzorky ze Slovenska vykazující podobný profil s částí vzorků z ČR a Polska ($\sim NJ^{\text{Groups B,C,D}}$); iii) vzorky ze severu Maďarska ($\sim NJ^{\text{Group G}}$); iv) skupina tvořená vzorky z jihu Maďarska a Rumunska, s několika vzorky z Polska a ČR ($\sim NJ^{\text{Groups F,E}}$) (Obr. 3).



Obr. 3. Výsledek Bayesovského clusterování programem STRUCTURE, rozděluje 84 jedinců *A. liliifolia* do dvou ($K = 2$) nebo pěti ($K = 5$) skupin. Každý vertikální sloupec představuje jednoho jedince, přičemž barevný profil jedince odpovídá pravděpodobnému zařazení daného jedince do jednoho nebo více skupin. Geografický původ analyzovaných vzorků je uveden pod diagramem.

d) *Komentář k výsledkové části a závěr*

V této studii bylo metodou AFLP analyzováno 84 jedinců *Adenophora liliifolia* z 23 lokalit ležících v pěti státech Střední Evropy. Celkem bylo hodnoceno 291 spolehlivě detekovatelných fragmentů, které byly použity pro výpočty základních indexů genetické variability a konstrukci diagramů graficky

Příloha 1.

znázorňujících vztahy mezi analyzovanými vzorky (Obr. 2,3; Tabulka 1). Byly zjištěny střední hodnoty genetické variability, které představují spíše rozdíly na úrovni jedinců než rozdíly mezi populacemi a ukazují na převahu pohlavního rozmnožování v populacích. Udržování genetické variability v populacích v důsledku časté výměny genetického materiálu ve formě pylu přeneseného hmyzem při opylení nebo transportu semen lze považovat za málo pravděpodobné. Populace jsou od sebe navzájem izolované a poměrně vzdálené (např. víc než 1000 km mezi lokalitou Babinské louky v ČR a lokalitou Prejmer v Rumunsku, nejbližší si jsou lokality ve středním Slovensku - 7 km). Nízký počet detekovaných privátních bandů, absence privátních fixovaných bandů, nízké hodnoty F_{ST} a nízká strukturovanost populací může naznačovat, že k izolaci a vzniku recentních populací došlo v relativně nedávné době.

Z geneticko-populačního hlediska lze hodnotit populace jako životaschopné s dostatečnou úrovní genetické variability, zabezpečující dostatečný zdroj přirozené variability v populacích. Na další pozitivní vývoj populací bude mít vliv hlavně početnost jedinců v jednotlivých populacích, poskytující zdroj variability a zabraňující snížení fitness inbrídingem.

V Olomouci 27.4.2016

RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Mgr. Lucie Marečková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky
Šlechtitelů 27
Olomouc-Holice
78371