

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Rebeka Matulová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Výber variabilných chloroplastových a
jadrových markrov pre štúdium evolučných
vzt'ahov v agregáte *Pinguicula vulgaris***

Bakalářská práce

Rebeka Matulová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2019

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

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Ľuboša Majeského, Ph.D. a za použitia uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci.....

.....

Rebeka Matulová

SÚHRN

Bakalárska práca sa zameriava na problém súvisiaci s taxonomickým postavením *Pinguicula bohemica* (tučnice českej) v rámci agregátu *Pinguicula vulgaris* (tučnice obyčajnej), a teda či tučnica česká predstavuje samostatný taxón odlišný od tučnice obyčajnej, alebo sa jedná len o morfológickú variabilitu bez významnejšej taxonomickej hodnoty. Cieľom práce bolo pokúsiť sa nájsť polymorfné molekulárne markre, pomocou ktorých by bolo možné odlíšiť tučnicu českú od tučnice obyčajnej a jej najčastejšej morfológickej variety tučnice obyčajnej dvojfarebnej (*P. vulgaris* var. *bicolor*).

Teoretická časť práce pozostáva z kapitoly zaoberajúcej sa súhrnnou charakteristikou rodu *Pinguicula*, nasledovanou popisom agregátu *Pinguicula vulgaris* a predstavením problematiky taxonomického zaradenia *P. bohemica*. Tretia kapitola vo všeobecnosti popisuje metódy založené na molekulárnych markroch využívané v taxonómii rastlín.

Experimentálna časť popisuje výsledky hľadania polymorfných molekulárnych markrov. V rámci tejto časti práce bolo pomocou PCR reakcie testovaných celkovo 16 lokusov (3 jadrové a 13 chloroplastových). V prípade úspešnej amplifikácie (2 jadrových a 9 chloroplastových) boli amplifikované lokusy sekvenované a sekvencie následne bioinformaticky spracované a navzájom porovnané zarovnaním. U dvoch jadrových lokusov bol detegovaný zmesný signál a navrhuje sa ďalšia analýza pre vytvorenie lokus-špecifických primerov. Z celkového počtu deviatich úspešne amplifikovaných chloroplastových lokusov v piatich nebol pozorovaný žiadny polymorfizmus. Vo zvyšných štyroch bol pozorovaný polymorfizmus, ktorý by mohol byť druhovo špecifickým pre taxón *Pinguicula bohemica*. Ako najvhodnejším lokusom pre ďalšie použitie sa zdajú byť lokusy *psbM-ycf6* a *trnQ-rps16*. Pre vyvodenie spoľahlivých taxonomických záverov je však nutné ďalšie štúdium väčšieho počtu vzoriek.

SUMMARY

This bachelor thesis is focused on the problem with the taxonomic delineation of *Pinguicula bohemica* (czech butterwort) in relation to *Pinguicula vulgaris* aggregate (common butterwort) whether the czech butterwort represents a distinct taxon that differs from the common butterwort, or the difference between these taxa represents morphological variability without a taxonomic value. The thesis aimed to find polymorphic molecular markers which will help to differentiate *P. bohemica* from common butterwort (*P. vulgaris* s. str.) and its most common morphological variety *P. vulgaris* var. *bicolor*.

The first part of the thesis represents brief characterization of the genus *Pinguicula* and is followed by a description of the investigated taxa *Pinguicula vulgaris* and *P. bohemica*, and part describing the problem with taxonomic delimitation of *P. bohemica*. In the third chapter basic molecular methods used in botanical research and plant taxonomy are described.

In the experimental section, the results of searching for polymorphic molecular markers are described. Altogether 16 loci (3 nuclear and 13 chloroplast) were tested for the presence of polymorphism using PCR reaction. In the case of successful amplification (two nuclear and nine chloroplast), amplified loci were sequenced, and sequences were bioinformatically processed, aligned and compared each to other. Two nuclear loci gave a mixed signal, and further optimization is suggested to design locus-specific primers. Within the rest nine successfully amplified chloroplast loci no polymorphism was observed in five of them. The remaining four loci showed some level of polymorphism that showed to be specific for *P. bohemica*. The most suitable loci for further use seems to be the *psbM-ycf6* and *trnQ-rps16* loci. To draw reliable taxonomic conclusions a further study of a larger set of samples is needed.

Podakovanie:

Na tomto mieste by som sa rada podakovala vedúcemu svojej bakalárskej práce RNDr. Ľubošovi Majeskému, Ph.D. za trpezlivosť, cenné rady a odbornú pomoc pri práci v laboratóriu i spracovávaní bakalárskej práce. Taktiež by som sa chcela podakovať svojej rodine a najbližším za ich podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1	Charakteristika rodu <i>Pinguicula</i>	3
3.2	<i>Pinguicula vulgaris</i> agg.	4
3.2.1	Morfologická charakteristika, ekológia a rozšírenie	5
3.2.2	Problematika taxonomického zaradenia <i>P. bohemica</i>	6
3.3	Využitie molekulárnych markrov v taxonómii	10
3.3.1	Izoenzýmy	10
3.3.2	Polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism)	11
3.3.3	Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA)	11
3.3.4	Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism)	12
3.3.5	Mikrosatelity (Simple Sequence Repeats – SSRs)	13
3.3.6	Sekvenovanie	14
4	MATERIÁLY A METÓDY	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Použité chemikálie, súpravy a roztoky	16
4.2.1	Použité chemikálie	16
4.2.2	Použité roztoky a ich príprava	16
4.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení	17
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	18
4.4.1	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	18
4.4.2	Elektroforetická separácia	19
4.4.3	Purifikácia PCR produktov pred sekvenovaním	20
4.4.4	Bioinformatická analýza	21
5	VÝSLEDKY	22
6	DISKUSIA	24
7	ZÁVER	26
8	LITERATÚRA	27
9	PRÍLOHY	33

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Zoznam použitých vzoriek a ich pôvod.	15
Tabuľka 2: Tabuľka uvádzajúca označenie testovaných lokusov, teplotu nasadenia primerov (TA), označenie použitých primerov a ich zdroj.	18
Tabuľka 3: Zloženie PCR reakčnej zmesi.	19
Tabuľka 4: Teplotný program použitý pre PCR reakcie pre testované lokusy.	19
Tabuľka 5: Výsledky testovania jednotlivých jadrových a chloroplastových lokusov.	22

1 ÚVOD

Agregát tučnice obyčajnej (*Pinguicula vulgaris* agg.) predstavuje skupinu blízko príbuzných druhov, v ktorom je možné na základe niekoľkých malých, avšak stálych morfológických znakov odlišiť viacero taxónov. Hlavnými taxónmi rozlišovanými v agregáte vyskytujúcimi sa na území Českej republiky sú tučnica obyčajná pravá (*P. vulgaris* L. [$\equiv$ *P. vulgaris* subsp. *vulgaris*]), tučnica česká (*P. bohemica* Krajina) a tučnica obyčajná dvojfarebná (*P. vulgaris* var. *bicolor* Nordst. ex Fries). Výskyt *P. vulgaris* var. *bicolor* bol zaznamenaný len v opustenom vápencovom lome Dolní Kamenárka pri Štramberku, avšak pôvodnosť tohto výskytu je otázna. *Pinguicula vulgaris* s. str. rastie najmä v horských a podhorských oblastiach na rašelinistiach a vlhkých stanovištiach. Jej výskyt v Českej republike nie je ojedinelý a možno ju nájsť v južných a západných Čechách ako aj v oblasti Hrubého Jeseníku. Naproti tomu tučnica česká je často vnímaná ako stenoendemitický druh Českej republiky (Studnička, 1989). Jej súčasný výskyt je obmedzený len na niekoľko lokalít na strednom Polabí a Ralsko-bezdežskej tabuli (Bělohávková, 2000; Válová 2010). Názory na taxonomickú hodnotu tučnice českej nie sú jednotné a vedľa seba koexistujú dva názory. Jeden jej prisudzuje postavenie samostatného druhu, zatiaľ čo ten druhý poukazuje na nápadnú podobnosť s morfológickou varietou tučnice obyčajnej s dvojfarebnou korunou – tučnicou obyčajnou dvojfarebnou. Na základe toho by sa tučnica česká nemala vyčleňovať ako samostatný druh na žiadnej taxonomickej úrovni. Zástancovia prvého názoru tvrdia, že tučnica česká by mala byť klasifikovaná ako samostatný druh na základe odlišného počtu chromozómov ($2n = 32$), dvojfarebnej koruny, tvaru kališných lupienkov a tvaru tobolek (Studnička, 1989; Bělohávková, 1989). Tučnica obyčajná má počet chromozómov $2n = 64$, farbu koruny od modrej až po čisto bielu, resp. dvojfarebnú modro-bielu (Bělohávková, 2000). Avšak ďalšie práce toto tvrdenie vyvracajú a poukazujú na to, že *P. bohemica* sa chromozómovým počtom nelíši od *P. vulgaris* (napr. Krahulcová et Jarolímová, 1991; Válová 2013; Majeský et al., unpublished). V tejto bakalárskej práci sme sa pokúsili o nájdenie špecifických polymorfizmov, ktoré by mohli pomôcť vyriešiť problematiku taxonomického postavenia tučnice českej.

2 CIELE PRÁCE

Cieľom práce je nájsť polymorfných chloroplastových a jadrových markrov, pomocou ktorých bude možné rozlíšiť taxón *Pinguicula bohemica* od *P. vulgaris* s. str. a *P. vulgaris* var. *bicolor*.

Postup práce:

- amplifikácia vybraných lokusov na ôsmich vzorkách zahrňujúcich taxóny (*Pinguicula bohemica*, *P. vulgaris* s. str. a *P. vulgaris* var. *bicolor*)
- sekvenovanie amplifikovaných lokusov
- bioinformatické spracovanie a vyhodnotenie získaných sekvencií
- identifikácia polymorfných lokusov

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1 Charakteristika rodu *Pinguicula*

Rod *Pinguicula* je rodom hmyzožravých rastlín, ktoré patria do čeľade Lentibulariaceae. Rod zahŕňa približne 91 druhov (Roccia *et al.*, 2016). Na území Českej republiky sa prirodzene vyskytujú len dva druhy z rodu *Pinguicula*, konkrétne *P. vulgaris* s. str. a *P. bohemica* a ich kríženec *P. × dostalii*. Oba druhy patria medzi ohrozené druhy a *P. bohemica* sa považuje za kriticky ohrozený ustupujúci endemit (Bělohávková, 1989; 2000). Okrem týchto druhov, je možné nájsť na území Českej republiky aj niekoľko nepôvodných druhov, ktoré boli s najväčšou pravdepodobnosťou umelo vysadené do prírody, pričom sa im darí prežívať na vhodných stanovištiach. Jedná sa o druhy: *P. hirtiflora* Ten., *P. crystallina* Sm., *P. grandiflora* Lam., *P. alpina* L. (www.pladias.cz; Majeský pers. communication).

Po morfologickej stránke sú tučnice rastliny vytvárajúce listové ružice, ktoré sú uchytené pomocou niekoľkých krátkych a nevetvených koreňov v substráte. V priebehu vývinu jedinca hlavný koreň zaniká a nahrádzajú ho tenké, krátke adventívne korene s jednoduchou vnútornou stavbou (Bělohávková, 1989). Listy tučníc sa medzi jednotlivými druhmi líšia a u väčšiny tropických druhov počas roka v závislosti na sezónnych zmenách podnebia dochádza k zmenám funkčného typu olistenia. Rozlišujú sa listy, ktoré majú iba asimilačnú funkciu a listy „hmyzožravé“. Odlišná funkcia listov má vplyv napríklad na počet listov v ružici, ich tvar, prípadne i anatómiu. Druhy rastúce v miernom klimatickom pásme, resp. v alpínskych až subalpínskych polohách vysokých pohorí, tvoria v období vegetačného pokoja (od jesene do jari) tzv. hibernakulá, t.j. drobné útvary s výrazne redukovanými šupinám podobnými listami tesne pritisnutými k sebe, chrániacimi rastové meristémy (Roccia *et al.*, 2016). Zo stvolu vyrastajú kvety na samostatných kvetných stopkách, pričom každá stopka nesie vždy len jeden kvet (výnimku predstavuje druh *P. ramosa* Miyoshi ex Yatabe, ktorý má na jednej kvetnej stopke dva a niekedy aj viac kvetov) (Roccia *et al.*, 2016). Kvet môže dosahovať veľkosť až 6 cm. Farba koruny býva medzi druhmi ale aj v rámci druhov premenlivá a väčšinou zahŕňa odtiene od bledých až k tmavomodrým a tmavofialovým (Studnička, 2006). Výnimočnú farbu koruny v rámci rodu predstavuje žltá (*P. lutea* Walter) a červená (*P. laeana* Speta & F.Fuchs) (Roccia *et al.*, 2016). Kalich je päťpočetný, dvojpyšský. Horný pysk má tri až sedem cípov, dolný pysk je dvojcípy (Bělohávková, 1989; Roccia *et al.*, 2016). Koruna je zrastená s ostrohou a je zreteľne alebo iba v náznaku dvojpyšká. Pysky sú rozdelené celkovo na päť lalokov, ktoré môžu byť u niektorých druhov navyše vykrojené alebo zubaté. Väčšina druhov sa dokáže rozmnožovať pohlavne i nepohlavne – vegetatívne pomocou dcérskych

pupeňov na základe životnej stratégie daného druhu. Plodom je tobolka, ktorá obsahuje stovky drobných súdkovitých až vretenovitých semien, ktoré sa rozširujú pomocou vody alebo vetra (Roccia *et al.*, 2016). „Hmyzožravosť“ u tučníc sa prejavuje pasívnym lapaním väčšinou drobného hmyzu, ktorý je následne trávený za pomoci vylučovaných proteolytických enzýmov. Na listoch plniacich „hmyzožravú“ funkciu sa nachádzajú dva typy žliazkatých trichómov. Väčšie stopkaté trichómy produkujúce lepkavý sekrét, ktorý funguje ako lepidlo a menšie sediace trichómy produkujúce proteolytické enzýmy, pomocou ktorých rastlina trávi telo lapenej koristi (Roccia *et al.*, 2016).

Celkový areál rodu je veľmi rozsiahly, avšak nesúvislý. Rozprestiera sa na oboch pologuliach, vo všetkých klimatických zónach na všetkých kontinentoch okrem Antarktídy a Austrálie (Studnička, 2006; Roccia *et al.*, 2016). Rod má dve významné vývojové centrá, jedno sa nachádza v subtropickej až tropickej oblasti Strednej Ameriky a zasahuje až do juhovýchodnej časti Severnej Ameriky, druhé centrum sa nachádza na severnej pologuli v subtropickej až temperátnej oblasti Európy (Bělohávková, 1989; Roccia *et al.*, 2016).

3.2 *Pinguicula vulgaris* agg.

Agregát tučnice obyčajnej (*P. vulgaris* agg.) zahŕňa niekoľko morfológicky a evolučne blízko príbuzných taxónov. Hlavným taxónom tejto skupiny je *P. vulgaris* L., druh s najväčším rozšírením v rámci celého rodu. Centrum rozšírenia tučnice obyčajnej je temperátna oblasť Európy, s presahom do Severnej Ameriky a Ázie (Roccia *et al.*, 2016). Jednotlivé taxóny z tohto okruhu sa líšia v niekoľkých morfológických znakoch prítomných hlavne na kvete a plode. Takými znakmi sú napr. tvar, farba, veľkosť a postavenie korunných lupienkov, tvar kališných lupienkov a tvar tobolky. Uvedené morfológické znaky sú však v rámci areálu *P. vulgaris* veľmi premenlivé (Roccia *et al.*, 2016). Aj napriek známej veľkej morfológickej plasticite vo vyššie spomenutých znakoch, mnohí autori vyčleňujú jednotlivé taxóny, pri ktorých sa stretáva práve prítomnosť určitej morfológickej odchýlky a izolovaný výskyt (v rámci celkového areálu *P. vulgaris*) s celkovo malým počtom lokalít a malou populačnou veľkosťou, na samostatné druhy resp. poddruhy. Ako príklad takéhoto prístupu môžu byť uvedené minimálne nasledujúce taxóny *P. fontiqueriana* Romo, Peris & Stübing, *P. vulgaris* subsp. *anzalonei* Peruzzi & F.Conti, *P. vulgaris* subsp. *ernica* Peruzzi & F.Conti, *P. vulgaris* subsp. *vestina* F.Conti & Peruzzi, alebo *P. vulgaris* var. *alpicola*, *P. vulgaris* var. *bicolor* a iné (Roccia *et al.*, 2016). Samotné rozlišovanie taxónov ostáva však veľmi problematické a v niektorých prípadoch, keď nie je známa lokalita, je takmer nemožné.

3.2.1 Morfológická charakteristika, ekológia a rozšírenie

***Pinguicula vulgaris* (tučnica obyčajná pravá)**

Stopkaté listy v prízemnej ružici s eliptickým až vajcovitým tvarom, lesklej zeleno až žltozelenej farby. Stvol žľaznato chlpatý. Kalich je dvojpyšký, na vonkajšej strane mierne žľaznato ochlpený, pričom horný pysk je trojcípy s trojuholníkovitými až podlhovasto kopijovitými kališnými cípmi. Dolný pysk je dvojcípy, cípy podlhovasté až vajcovité, tupo zašpicatené. Koruna je dvojpyšká, modrofialová s belavou škvrnou v ústí korunnej rúrky. Laloky horného pysku sú obdĺžnikovité, zaokrúhlené, laloky dolného pysku sú väčšie a navzájom oddialené, obdĺžnikovité, zaokrúhlené až mierne uťaté, ploché, na báze chlpaté. Korunná trubka je lievikovitá. Počet chromozómov $2n = 64$.

Tučnica obyčajná sa vyskytuje na mnohých stanovištiach, napríklad na rašelinistiach, rašelinných lúkach a pastvinách, na brehoch potokov a rybníkov i na pramenitých horských svahoch. Oblubuje slnečné až polotienisté stanovištia, kde sa nachádzajú nižšie počty konkurenčných druhov. Rastie najmä na humolitoch, ale i na piesčitých, jemne štrkovitých prevzdušnených pôdach so slabo kyslým až slabo zásaditým pH.

Daný druh je najrozšírenejší v južných a západných Čechách, v oreofytiku, termofytiku a v niekoľkých chladnejších územiach mezofytika. Najhojnejší výskyt tučnice obyčajnej je na Šumave, v Krušných horách, v Šumavsko-Novohradskom podhorí a v minulosti sa pravdepodobne malá populácia vyskytovala aj v oblasti Krkonoš, avšak dnes už neexistuje. Z pôvodných 20 lokalít Českého termofytika sa zachovali len dve. Na území Moravy rastie najmä v Hrubom Jeseníku. V nižších polohách postupne mizne vplyvom odvodňovania a hospodárskej činnosti (Bělohávková, 2000; Válová, 2010).

***Pinguicula bohemica* (tučnica česká)**

Listy prízemnej ružice sú stopkaté, pritlačené k zemi, eliptického až vajcovitého tvaru, zaokrúhlené, zelenej až žltozelenej farby. Kvety vyrastajú samostatne na vrchole kvetnej stopky. Kvet má dvojpyšký kalich, horný pysk je trojcípy, dolný dvojcípy, kališné cípy sú široko trojuholníkovité až obdĺžnikovité a zaokrúhlené. Koruna je dvojpyšká, na vonkajšej strane riedko žliazko-chlpatá, belavej až bledofialovej farby. V ústí korunnej rúrky sa nachádza tmavofialová priečna škvrna. Kvinte od mája do júna. Počet chromozómov $2n = 64$.

Tučnica česká uprednostňuje slnečné až mierne zatienené stanovištia, ktoré majú vysokú hladinu spodnej vody a občas bývajú zaplavované. Vyskytuje sa na slatinách, kde vyviera voda bohatá na uhličitý vápenatý, na mezotrofných, neutrálnych až slabo zásaditých

pôdach. Tučnica česká rastie v krátkosteblových a rozvoľnených porastoch, v ktorých bývajú hojne zastúpené rôzne druhy machorastov (Bělohlávková, 2000).

Tučnica česká je v súčasnosti chápaná ako endemický taxón Českej republiky a radí sa medzi kriticky ohrozené druhy českej flóry, čím je zákonom chránená (www.mzp.cz). Počet lokalít, kde sa v súčasnosti vyskytuje, neustále klesá, nakoľko sú jej prirodzené stanovištia znehodnocované vplyvom hospodárskej činnosti, najmä odvodňovaním, zaorávaním a zarastaním (Studnička, 1986). V Českej republike sa tučnica česká vyskytuje len v oblasti Českej kriedovej tabule, v strednom Polabí (fytogeografická provincia České termofytikum) a v oblasti Ralsko-bezděskej tabule (fytogeografická provincia Českomoravské mezofytikum) (Bělohlávková, 1989; Válová, 2010). Tučnica česká je rozšírená v planárnom (roviny, 150-210 m n. m.) až suprakolínnom (pahorkatiny a vrchoviny, 200-550 m n. m.) stupni. Mnohé historicky známe Polabské lokality vplyvom ľudskej činnosti zanikli (Bělohlávková, 1989; Skalický, 1988; Válová, 2010).

3.2.2 Problematika taxonomického zaradenia *P. bohemica*

Od objavenia a publikovania popisu tučnice českej V. Krajinom v prvej polovici dvadsiateho storočia (Krajina, 1927) sa vedú diskusie o tom, na akej taxonomickej úrovni by mal byť tento taxón klasifikovaný. Názory sú nejednotné a diskutuje sa o tom, či by mala byť *P. bohemica* označená ako samostatný druh, poddruh, prípadne varieta. Krajina postavil popis nového druhu tučnice z Polabia na odlišnostiach v tvare kalicha, tvare a farbe kvetu a v tvare tobolky v porovnaní s tučnicou obyčajnou. V popise Krajina porovnáva tučnicu českú so všetkými v tom období známymi európskymi zástupcami rodu (*P. lusitanica* L., *P. villosa* L., *P. norica* Beck $\equiv$ *P. vulgaris*, *P. alpina*, *P. hirtiflora*, *P. crystallina*, *P. corsica* Bernard & Gren., *P. longifolia* Ramond ex DC, *P. vallisneriaefolia* Webb., *P. reichenbachiana* Schindl., *P. leptoceras* *P. vulgaris* Rchb., *P. grandiflora*). V práci Krajina spomína aj veľkú morfológickú premenlivosť tučnice obyčajnej a medzi inými aj taxón *P. vulgaris* var. *bicolor*, morfológickú varietu s dvojfarebnou korunou, veľmi podobnú práve popisovanej tučnici českej. Napriek výraznej podobnosti medzi týmito dvoma taxónmi usudzuje, že v ostatných znakoch je tučnica česká dostatočne odlišná. Avšak už krátko po uverejnení popisu Krajinom, Domin vo svojej práci „*Plantarum Czechoslovakiae enumeration species vasculares indigenas et introductas exhibens*“ (Domin, 1935) priradil tučnici českej status poddruhu *P. vulgaris* subsp. *bohemica* (Krajina) Domin. Klasifikácia na úrovni poddruhu sa objavuje i v neskorších prácach a to hlavne v Květeně ČSR a Klíči k úplné květeně ČSR (Dostál, 1950; 1958). V iných

prácach bola tučnica česká klasifikovaná na úrovni variety, prípadne iba ako synonymum k menu *P. vulgaris* (Klika, 1947; Ernst, 1961). Významný nemecký botanik a odborník na rod *Pinguicula* Jost Casper v monografickej práci venovanej európskym tučniciam neprisudzuje morfológickým znakom, definujúcim tučnicu českú ako samostatný druh, veľkú váhu a zastáva názor, že sa jedná len o lokálnu morfológickú odchýlku tučnice obyčajnej (Casper, 1966)

V ďalších rokoch sa podrobne danej problematike venoval český botanik M. Studnička, ktorý sa zaslúžil o opätovné uznanie tučnice českej ako samostatného druhu. Zameral sa najmä na morfológické znaky (veľkosť listov, dĺžka stvolu a koruny, počty listov, rozmery semien, atď.) a karyológiu (Studnička, 1989). Jedným z hlavných argumentov Studničku, k uznaniu tučnice českej ako samostatného endemického druhu, bol ním stanovený počet chromozómov, ktorý je v rámci celého agregátu *P. vulgaris* výnimočný. Jednotlivé taxóny v rámci *P. vulgaris* agg. majú $2n = 64$ chromozómov, čo pri základnom chromozómovom čísle pre túto skupinu $x = 8$ predstavuje oktoploidnú úroveň. Studnička však stanovil pre tučnicu českú $2n = 32$ (Studnička, 1989). Tento počet chromozómov poukazuje na tetraploidný cytotyp. V prípade rodu *Pinguicula*, podobne ako aj pri ostatných rodoch, platí, že čím je druh mladší, tým vyššia je úroveň jeho ploidie a miera morfológickej premenlivosti (Casper et Stimper, 2009; Roccia et al., 2016). To by potom znamenalo, že tučnica česká je evolučne starším taxónom, než tučnica obyčajná a je zároveň priamym predkom tučnice obyčajnej (Majeský pers. communication). Rovnaký názor na taxonomické zaradenie tučnice českej má Bělohlávková, ktorá uznáva rovnaké morfológické znaky ako Studnička a považuje ich za dostatočné na uznanie tučnice českej na úrovni samostatného druhu. Ich názor na počet chromozómov je však rozdielny, nakoľko Bělohlávková uvádza počet chromozómov $2n = 64$ (Bělohlávková, 1989). V nasledujúcich rokoch bola tučnica česká objektom skúmania aj v ďalších prácach. Krahulcová a Jarolímová sa zaoberali problematikou rozdielnych chromozómovových počtov a opakovaným karyologickým analyzovaním rastlín potvrdili tvrdenie Bělohlávkovej, že tučnica česká je oktoploid so somatickým počtom chromozómov $2n = 64$ (Krahulcová et Jarolímová, 1991). K danej téme sa opäť vrátil Studnička v spolupráci s Hejným, ktorí na základe morfológických odlišností naďalej obhajovali druhové postavenie tučnice českej, avšak ich názor na počet chromozómov zostal naďalej nezmenený ($2n = 32$) aj napriek ďalším prácam, ktoré toto tvrdenie vyvrátili (Studnička et Hejný, 1992).

Kvĕtena ČR uvádza tučnicu českú ako samostatný druh (Bělohlávková, 2000), avšak o dva roky neskôr je tučnica česká v Klíči ke kvĕteně ČR označená ako poddruh tučnice obyčajnej (*P. vulgaris* subsp. *bohemica*) (Kubát, 2002). Názory v zahraničných publikáciách sú taktiež nejednotné, niektoré sa prikláňajú k druhovému postaveniu tučnice českej, napr.

Degtjareva (2006) a Casper *et* Stimper (2009), niektoré tomuto taxónu neprikladajú veľký význam, ako napríklad recentná monografia rodu *Pinguicula* od Roccia *et al.* (2016).

Spory o taxonomickom postavení tučnice českej a počte chromozómov mohla definitívne ukončiť karyologická monografia rodu *Pinguicula* od Caspera a Stimpera (2009). V tejto práci Casper prehodnotil svoje tvrdenia zo starších prác (1962, 1966) a prikláňa sa k názoru, že tučnica česká by mala byť klasifikovaná na úrovni druhu. V tejto práci uvádzajú pre tučnicu českú dva cytotypy na základe spočítaných chromozómov: $2n = 32$ – tetraploidný a $2n = 64$ – oktoploidný cytotyp. Túto problematiku uzatvárajú s tým, že populácie *P. bohemica* sú pravdepodobne cytotypovo zmiešané, čo vysvetľujú introgresiou, (Casper *et* Stimper, 2009).

Výskumu morfolologickej premenlivosti taxónu *P. vulgaris* v prirodzených populáciách v oblasti Západných Karpát na území Slovenskej republiky sa venovala Bernátová. Študovala farebnú premenlivosť korunných lalokov a morfológickú stavbu kvetu. Podľa jej pozorovaní je možné na území Slovenskej republiky rozlíšiť 5 ustálených typov zafarbenia koruny: a) jednofarebná čisto biela koruna; b) dvojfarebná koruna s bielymi lalokmi horného i dolného pysku koruny; c) dvojfarebná koruna s dvojfarebným pyskom (laloky spodného pysku biele, laloky vrchného pysku modrofialové); d) dvojfarebná koruna s modrofialovými lalokmi pyskov a čisto bielou korunnou rúrkou; e) celá koruna modrofialová s bielou škvrnou v ústí hrdla rúrky na dolnom pysku koruny. Z výsledkov usúdila, že oddelenie tučnice českej na úrovni druhu i označenie endemit sú problematické a spochybniteľné, nakoľko špecifické znaky prisudzované tučnici českej ju nedovoľujú spoľahlivo odlíšiť od *P. vulgaris* (Bernátová, 2010).

V nedávnej minulosti sa problematikou tučnice českej vo vzťahu ku komplexu tučnice obyčajnej venovala vo svojej diplomovej práci Válová. Pre účely porovnania relatívnej veľkosti genómu (teda ploidnej úrovne) využila metódu prietokovej cytometrie a na stanovenie genetickej podobnosti/odlišnosti taxónov v rámci agregátu využila metódu AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Pomocou prietokovej cytometrie stanovila relatívne množstvo DNA pre 116 jedincov troch taxónov *P. vulgaris* s. str. , *P. vulgaris* var. *bicolor* a *P. bohemica*. Výsledky merania nepreukázali významné rozdiely v relatívnom množstve DNA, i keď analyzované jedince tučnice českej vykazovali spomedzi troch skúmaných taxónov najvyššie hodnoty (Válová, 2013). Tieto zistenia nepoukazujú na výrazné rozdiely v stupni ploidie medzi analyzovanými vzorkami, respektíve taxónmi, aké by sa očakávali v prípade, ak by tučnica česká mala byť tetraploidným taxónom. Výsledky skôr poukazujú na fakt, že všetky tri skúmané taxóny majú zhodnú úroveň ploidie, a to oktoploidnú. V práci však chýba štatistické spracovanie výsledkov cytometrických meraní a priame stanovenie počtu chromozómov pre študované taxóny. Metóda AFLP však ukázala, že aj napriek výraznej

genetickej podobnosti študovaných taxónov tučnica česká, na rozdiel od zvyšných dvoch taxónov tučnice obyčajnej a tučnice obyčajnej dvojfarebnej, ktorých analyzované populácie vytvárali premiešané zhľuky, vytvára samostatný genetický zhľuk (Válová, 2013).

V súčasnosti prebieha na Katedre botaniky Univerzity Palackého výskum tučnice českej a jej vzťahov s ďalšími taxónmi v rámci agregátu tučnice obyčajnej (*P. vulgaris* agg.), ktorý nadväzuje na vyššie spomenutý výskum. Tento výskum má za cieľ: 1) vyvrátiť, prípadne potvrdiť tetraploidný status *P. bohémica*; 2) zistiť mieru genetickej premenlivosti v agregáte *Pinguicula vulgaris*; 3) ak existujú, nájsť vhodné molekulárne markre, na základe ktorých by bolo možné odlišiť taxón *P. bohémica*; 4) určiť možné vzťahy medzi taxónmi v skúmanom agregáte. Na dosiahnutie týchto cieľov sa používa prietoková cytometria (určenie veľkosti genómu a ploidnej úrovne), rastrovacia elektrónová mikroskopia (porovnanie mikroskopickej štruktúry povrchu semien) a metódy molekulárnej biológie, konkrétne AFLP a sekvenovanie jadrových a chloroplastových markrov (určenie miery genetickej podobnosti/príbuznosti medzi skúmanými taxónmi).

Doterajšie výsledky nepreukázali žiadnu premenlivosť ploidie medzi tromi vybranými taxónmi (*P. bohémica*, *P. vulgaris* s. str. , *P. vulgaris* var. *bicolor*), ktorá je približne rovnaká (jedná sa oktoploidné taxóny s počtom chromozómov $2n \approx 64$). V prípade veľkosti genómu existujú rozdiely medzi študovanými taxónmi, pričom tučnica česká má z vyššie spomenutej trojice najmenšiu veľkosť genómu. Analýza semien pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu neukázala žiadne významné odlišnosti v tvare a celkovej morfológii pozorovaných semien. Tvar semien bol vo väčšine prípadov pravidelne cylindrický až elipsoidný, mikromorfológia semenného obalu bola podobná. Molekulárne markre ukazujú, že medzi skúmanými taxónmi existuje blízky vzťah a premenlivosť *P. bohémica* je len na veľmi nízkej úrovni. Použitá metóda AFLP ukázala, že *P. bohémica* predstavuje samostatnú skupinu v rámci *P. vulgaris* agg., charakterizovanú niekoľkým jedinečnými AFLP markrami. Doterajšie sekvenovanie jedného jadrového (*ITS1-5.8S-ITS2*) a jedného chloroplastového (*trnT-trnF*) markru ukázalo navyše prítomnosť troch variabilných miest (dvoch v sekvenovanom chloroplastovom a jedného v jadrovom lokuse), ktoré odlišujú tučnicu českú od ostatných skúmaných taxónov v rámci agregátu *P. vulgaris*. Tieto identifikované polymorfizmy však nie sú dostatočné na vyvodenie záverov o taxonomickom postavení tučnice českej, a preto je nutné hľadať existenciu ďalších genetických markrov (Majeský *et al.*, nepublikované výsledky).

3.3 Využitie molekulárnych markrov v taxonómii

V minulosti, pred rozvojom molekulárnych techník, sa v systematike a taxonómii rastlín využívali najmä morfológické znaky, ako napríklad symetria kvetu, počet tyčiniek, farba korunných lalokov a rozmery korunnej rúrky, habitus, typ embrya, postavenie listov, ochlpenie, typ plodu a ďalšie (Linné 1753; De Candolle 1844; Ernst 1961; Rodondi *et al.* 2010). S rozvojom molekulárnych techník sa v taxonómii čoraz viac začalo uplatňovať skúmanie odlišností na úrovni DNA pomocou molekulárnych markrov. Molekulárne markre sú určité úseky DNA, ktoré svojim usporiadaním vypovedajú o príbuznosti jedincov, populácií a druhov. Zavedenie molekulárnej biológie, bioinformatiky a genomiky prinieslo nový pohľad na taxonómiu organizmov. Existuje množstvo typov techník využívaných k biosystematickému štúdiu rastlín a ich počet sa neustále zvyšuje. Nižšie je uvedený stručný popis najbežnejších a najčastejšie využívaných techník.

3.3.1 Izoenzýmy

Izoenzýmy boli prvým molekulárnym markerom využitým pri štúdiu variability rastlín. Izoenzýmová analýza sa uplatňovala viac ako 60 rokov pre rôzne výskumné účely, napríklad pri štúdiu fylogenetických vzťahov a genetickej premenlivosti, štúdiu populácií a šľachtení (Staub *et Meglic*, 1993). Pojem izoenzym označuje enzýmy, ktoré katalyzujú rovnakú chemickú reakciu, avšak majú odlišnú primárnu štruktúru, na základe ktorej je možné jednotlivé izoenzymy od seba odlíšiť. Pri ich analýze sa využíva rozličná mobilita jednotlivých štruktúr v jednosmernom elektrickom poli pri elektroforetickej separácii (Hadačová *et Ondřej*, 1972; Vallejos, 1983; Soltis *et Soltis*, 1989).

Výhodou využitia izoenzymov je jednoduchosť metódy, kodominantný charakter markeru, možnosť štúdia veľkého množstva lokusov a získanie veľkého množstva alel. Ďalšími výhodami využitia izoenzymov je rýchlosť a finančná nenáročnosť analýzy.

Na druhej strane, izoenzymy majú nízku variabilitu a nízku úroveň polymorfizmu, čo je ich hlavnou nevýhodou. Navyše je pri skúmaní izoenzymov nutné pracovať s čerstvým rastlinným materiálom a toxickými chemikáliami. Problémové môže byť taktiež vyhodnotenie enzýmov s kvartérnou štruktúrou. Pre tieto dôvody sú izoenzymy v súčasnosti nahrádzané spoľahlivejšími a citlivejšími markermi (Vallejos, 1983; Baes *et Cutsem*, 1993; Hudson *et al.*, 1994).

3.3.2 Polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP je metóda založená na štiepení DNA restriktčnou endonukleázou a nasledovaná hybridizáciou a separáciou rozštiepených fragmentov pomocou agarózovej elektroforézy. RFLP markre patria k prvej generácii molekulárnych markrov a boli využívané najmä v 80. a 90. rokoch minulého storočia (Jones *et al.*, 2009). Metóda je založená na detekcii zmien (napr. inzercií a delecií) v nukleotidových sekvenciách, ktoré je možné detegovať pomocou špecifických restriktčných endonukleáz. Činnosťou daných endonukleáz je extrahovaná DNA štiepaná na fragmenty, ktoré sú rozdelené pomocou elektroforetickej separácie a následne je vykonaný „southern blotting“, čím sa vzorky prenesú na nitrocelulózovú membránu, kde je vizualizovaná iba časť fragmentov s použitím špecifickej sondy (Southern, 1975). Sondami sú napríklad umelo syntetizované rádioaktívne značené oligonukleotidové sekvencie, avšak je možné taktiež pracovať s nerádioaktívne značenými sondami (Řepková *et Relichová*, 2001). Variabilita, ktorá je daným spôsobom detegovaná, ukazuje jednobodové mutácie v pôvodných restriktčných miestach, prípadne dokazuje inzercie a delécie vyskytujúce sa v analyzovanom úseku. RFLP metódu je možné využiť napríklad pri štúdiu fylogenetických vzťahov a genetickej diverzity (Avisé, 2004; Sun *et al.*, 2001; Weising *et al.*, 2005), pri mapovaní génov a tvorbe restriktčných máp (Ahn *et Tanksley*, 1993).

RFLP markre vykazujú relatívne vysoký stupeň polymorfizmu, sú vysoko reprodukovateľné, nie je nutné poznať nukleotidovú sekvenciu a majú vysokú lokusovú špecifitu (Agarwal *et al.*, 2008; Lateef, 2015), avšak daná metóda má aj niekoľko negatív, ku ktorým patrí časová a finančná náročnosť, taktiež vyžaduje veľké množstvo rastlinného materiálu, čistú DNA a rádioaktívne a toxické reagenty (Karp *et al.*, 1996; Piola *et al.*, 1999).

3.3.3 Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA)

Metóda RAPD je založená na náhodnej amplifikácii DNA fragmentov, pričom zahŕňa použitie iba jedného krátkeho oligonukleotidového primeru s dĺžkou približne 10 bp na zmnoženie segmentov genomickej DNA. Vďaka svojej dĺžke a zníženej teplote pri nasadení primerov sa zvyšuje pravdepodobnosť ich nasadnutia na viacerých miestach vlákna DNA. Dané krátke primery patriace k univerzálnym a nešpecifickým primerom sa využívajú k odhaleniu polymorfizmu v amplifikovaných produktoch, ktoré sú zviditeľnené pomocou agarózovej elektroforézy (Williams *et al.*, 1990; Varshney, 2013). RAPD patrí medzi tzv. dominantné

markre, pri ktorých sa hodnotí len prítomnosť alebo neprítomnosť daného znaku, hodnotia sa teda len homozygóty (dominantné a recesívne) no nie je možné rozlíšiť heterozygótov.

Najväčšou výhodou RAPD metódy je, že nevyžaduje predchádzajúcu znalosť genómovej sekvencie a môže byť prevedená aj s malým množstvom DNA. Môže byť využitá napríklad pri štúdiu genetickej variability populácií a fylogenetických vzťahov. RAPD markre boli najčastejšie využívané pre stanovenie fylogenetických vzťahov medzi druhmi a na vnútrodruhovej úrovni, avšak nie sú vhodné pri riešení taxonomických problémov na vyššej ako druhovej úrovni (Gupta *et al.*, 1999). Hlavnou nevýhodou RAPD je hlavne nízka reprodukovateľnosť a spoľahlivosť, nakoľko u identických vzoriek dochádza medzi rôznymi laboratóriami k odlišným výsledkom, preto sa častejšie volia iné metódy (mikrosatelity, AFLP) (Jones *et al.*, 1997).

3.3.4 Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism)

Metóda AFLP sa začala rozvíjať na začiatku 90. rokov minulého storočia (Vos *et al.*, 1995). Metóda spočíva v selektívnej amplifikácii restričných fragmentov naprieč celým genómom. V prvom kroku je nutné rozštiepiť genomickú DNA na fragmenty pomocou dvoch restričných enzýmov (najčastejšie sa k tomu používajú *EcoRI* a *MseI*), vďaka čomu vzniknú 3 rôzne typy fragmentov s tzv. lepivými koncami. Následne sa prevádza ligácia krátkych nasyntetizovaných adaptorov, ktoré sú následne využité pri PCR reakcii. Potom nasleduje preselektívna amplifikácia s pomocou dvojice primerov, ktoré sú komplementárne k sekvencii adaptorov. Dané primery navyše na 3' konci obsahujú nukleotid, ktorý zasahuje do vnútra amplifikovaných fragmentov a zabezpečí tak selekciu len tých fragmentov, ktoré vznikajú pri štiepení pomocou oboch použitých restričných enzýmov (*EcoRI* a *MseI*), čím sa zredukuje množstvo fragmentov v zmesi (Savelkoul *et al.*, 1999). Ďalšia redukcia sa docieľa pridaním vhodných PCR primerov, ktoré obsahujú selektívne nukleotidy v tzv. selektívnej amplifikácii. Vďaka použitiu rôznych kombinácií primerov je možné detegovať desiatky až stovky vysoko polymorfných markrov. Na záver sú amplifikované fragmenty elektroforeticky separované a vizualizované pomocou striebra, autoradiografie alebo fluorescencie, čím sa získa unikátny a reprodukovateľný „fingerprint“ (Vos *et al.*, 1995; Nicod *et al.*, 2003).

AFLP metóda má mnoho výhod, je napríklad veľmi citlivá a taktiež vysoko reprodukovateľná. Výhodou je aj nízka finančná náročnosť, nakoľko umožňuje detegovať veľké množstvo koamplifikovaných restričných fragmentov, vyžaduje stredné množstvo

DNA a v porovnaní s RFLP je vhodnejšia pre určovanie polymorfizmov (Gupta *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2010). Na druhej strane metóda AFLP vyžaduje dôslednú optimalizáciu a v porovnaní s RAPD je finančne nákladnejšia. Taktiež si vyžaduje vysokú čistotu skúmaných vzoriek DNA a použitie toxických polyakrylamidových gélov (Weising *et al.*, 2005). Využitie metódy AFLP je široké, môže byť využitá napríklad pri fylogenetickej analýze blízko príbuzných druhov, dokazovaní klonov a kultivarov, mapovacích štúdiách i štúdiu génovej expresie (Vos *et al.*, 1995).

3.3.5 Mikrosatelity (Simple Sequence Repeats – SSRs)

Mikrosatelitové markre sú jednoduché repetitívne sekvencie skladajúce sa z tandemovo sa opakujúcich krátkych nukleotidových motívov (1 – 5 nukleotidov v repetícii). Sú kodominanté a vysoko variabilné, čo z nich robí vhodné molekulárne markre. Polymorfizmus mikrosatelitov spočíva najmä v rozdielnom počte opakovaní základného motívu. K týmto zmenám pravdepodobne dochádza v dôsledku tzv. skĺznutia DNA polymerázy počas replikácie, bodovými mutáciami v okolí mikrosatelitového lokusu, prípadne inzerciami a deléciami častí sekvencií mikrosatelitových lokusov (Weising *et al.*, 2005).

Pri mikrosatelitovej analýze je potrebné v prvom kroku získať mikrosatelitové markre pomocou PCR reakcie s komplementárnymi primermi. Dané primery musia byť komplementárne k sekvenciám, ktoré obklopujú skúmané mikrosatelitové lokusy. Amplifikované PCR produkty sa následne separujú na polyakrylamidovom gély a vizualizujú rádiograficky, fluorometricky, prípadne striebrom alebo etídium bromidom (Weising *et al.*, 2005). Taktiež je možné separáciu previesť pomocou kapilárnej elektroforézy.

V porovnaní s AFLP a RFLP sú mikrosatelity vysoko spoľahlivé a vyžadujú menšie množstvo DNA (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Mikrosatelity sú obľúbené vďaka svojej vysokej reprodukovateľnosti, kodominantnej povahe a väčšinou vysokému stupňu polymorfizmu i možnosti medzidruhového použitia navrhnutých primerov (Li *et al.*, 2002; Weising *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2008). Hlavnou nevýhodou metódy je časová náročnosť navrhovania lokusovo špecifických primerov (Squirrell *et al.*, 2003). AFLP metóda a mikrosatelity nachádzajú uplatnenie v botanike, avšak nie je vhodné pomocou nich skúmať vzťahy na vyšších taxonomických úrovniach, ako sú napríklad rody a druhy. Spomínané metódy sú však ideálne pre štúdium vzťahov medzi populáciami a v rámci druhu.

3.3.6 Sekvenovanie

Vďaka sekvenovaniu je dnes možné určiť presné poradie nukleotidov v konkrétnych úsekoch DNA a tým získať prístup k detailnej štruktúre skúmaných vzoriek. Získané informácie môžu byť následne zdieľané a porovnávané prostredníctvom internetových databáz. História sekvenovania začala v druhej polovici minulého storočia, kedy Sanger predstavil svoju enzymatickú metódu sekvenovania. Podstata metódy spočíva v terminácii syntézy vznikajúceho reťazca DNA za použitia fluorescenčne značených dideoxyribonukleotidov, ktorým chýba hydroxylová skupina na 3' uhlíku, v dôsledku čoho sa ďalšie deoxyribonukleotidy nemôžu naviazať. Každý deoxyribonukleotid nesie špecifickú fluorescenčnú značku s charakteristickou farbou, ktorú je možné sledovať v konečnom výstupe. Výsledkom PCR reakcie je zmes fragmentov s rôznou dĺžkou a každý fragment nesie na svojom konci fluorescenčne značený nukleotid. Pomocou sekvenátora sa amplifikované fragmenty zoradia vzostupne podľa dĺžky a výsledný chromatogram je použitý pri ďalších analýzach (Sanger *et al.*, 1977).

Vyššie uvedené metódy štúdia variability rastlín (RFLP, RAPD, AFLP, mikrosatelity a sekvenovanie krátkych úsekov DNA) sú v súčasnosti vďaka pokrokom v genomike postupne nahrádzané technológiami celogenómového sekvenovania (NGS – Illumina, SOLiD, 454 sekvenovanie), avšak ich uplatnenie je stále obmedzené kvôli finančnej náročnosti metód a taktiež možnosťami analýzy a následnej interpretácie získaných informácií. Sekvenovanie rôznych genómových lokusov sa využíva v botanickom výskume na rôznej úrovni, od najnižšej populačnej až po najvyššiu medzi čeľad'ami a kladmi.

4 MATERIÁLY A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Pre jednotlivé analýzy bolo použitých osem testovacích vzoriek pochádzajúcich zo štyroch lokalít. Tieto vzorky sú súčasťou väčšieho setu vzoriek agregátu *Pinguicula vulgaris*, študovaného na Katedre botaniky. Testovacie vzorky boli vybrané s ohľadom na to, aby v nich boli zahrnuté tri hlavné taxóny skúmaného agregátu (*P. vulgaris* s. str, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*). Zoznam testovaných vzoriek a ich pôvod je súčasťou Tabuľky 1. Genomická DNA (gDNA) bola vyizolovaná bývalou študentkou Mgr. Lenkou Válovou, v rámci jej diplomovej práce. Vyizolovaná gDNA bola uchovávaná v mrazničke pri teplote – 80 °C. Pred začiatkom testovania lokusov bola gDNA nariedená na koncentráciu približne 20 ng/μl. Takto nariedené vzorky boli použité pre PCR reakcie a boli skladované v chladničke pri teplote 4 °C.

Tabuľka 1: Zoznam použitých vzoriek a ich pôvod.

Taxón	Označenie	Lokalita	Zemepisná šírka	Zemepisná dĺžka	Nadmorská výška
<i>P. vulgaris</i>	VU_NOR_1_d	Nórsko, medzi mestami Haugastøl a Ustaostat	60°30'15"	07°56'49"	980 m
<i>P. vulgaris</i>	VU_NOR_2_a				
<i>P. vulgaris</i>	VU_NOR_2_d				
<i>P. vulgaris</i>	VU_SK_a	Slovensko, Vážecké lúky, neďaleko obce Vážec	49°04'48"	19°58'20"	800 m
<i>P. bohemica</i>	BO_BR_a	Čechy, Baronský rybník	50°36'10"	14°37'22"	260 m
<i>P. bohemica</i>	BO_BR_b				
<i>P. bohemica</i>	BO_BR_e				
<i>P. vulgaris</i> var. <i>bicolor</i>	BI_SK_1_a	Slovensko, Malá Fatra, lúky v blízkosti obce Vrúcko	48°57'19"	18°40'07"	620 m

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

5X DNA Red Loading Buffer (BIOLINE, kat. č. BIO-37068)

Agaróza (Serva, kat. č. 11404.05)

Deionizovaná voda

Etanol (LachNer, kat.č. 20025-A96)

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotum, kat. č. 41001)

HyperLadder™ 100 bp (BIOLINE, kat. č. BIO-33029)

KAPA dNTPs Kit (Kapa Biosystems, kat. č. KK1007)

KAPA Taq DNA Polymerase (Kapa Biosystems, kat. č. BK1000)

Kyselina boritá (LachNer, kat. č. 10017-CP0)

Disodná soľ kyseliny etyléndiamintetraoctovej, dihydrát ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134-250G)

MyTaq™ Red DNA Polymerase (BIOLINE, kat. č. BIO-21109)

Polyetylén glykol 6000 (PEG-6000) (Sigma-Aldrich, kat. č. 81260)

Trishydroxymetylaminometán (TRIS) (VWR Life Science, kat. č. 0826-500G)

4.2.2 Použité roztoky a ich príprava

10X TBE pufor: 108 g TRIS-u rozpustiť za nepretržitého miešania v 900 ml dH_2O , pridať 55 g kyseliny boritej a 40 ml 0,5 M EDTA (pH=8), doplniť do 1000 ml.

0,5X TBE pufor: zásobný roztok 10X TBE zriediť 20X, napr. na prípravu 5 l je potrebné zmiešať 250 ml 10X TBE so 4750 ml dH_2O .

70% etanol: 73 ml 96% etanolu doplniť destilovanou vodou do objemu 100 ml.

20% PEG (2,5 mM NaCl): rozpustiť 20 g PEG-6000 v 70 ml destilovanej vody, pridať 14,6 g NaCl, po rozpustení doplniť objem do 100 ml.

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

Analytické váhy KERN 572-35 (KERN & SOHN GmbH)

Elektroforetická komôrka Owl EasyCast B1 (Thermo Scientific)

Elektroforetická komôrka Wide Mini-Sub (BIORAD)

Chladená vákuová sušička (LABCONCO)

Mikropipety Eppendorf, 0.1 – 1000 µl (Eppendorf)

Mikrovlnná rúra ETA 3203 (ETA)

Minicentrifúga MiniStar silverline (VWR)

Stolná centrifúga Eppendorf 5418 D (Eppendorf)

Termocykler Eppendorf Mastercycler pro S (Eppendorf)

UV dokumentačný systém Fire-Reader V4 UVI-1D (UVITEC)

Vortex MS2 Minishaer (IKA)

Zdroj jednosmerného napätia Minis-300 (Major Science)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Na testovanie vhodných polymorfných lokusov bolo vybraných 13 chloroplastových a 3 jadrové lokusy. Testované boli nasledujúce jadrové: *PPC*, *topo6* a *isi* a chloroplastové lokusy: *psbM-ycf6*, *trnC-ycf6*, *trnQ-rps16*, *rpS16*, *trnD-trnT*, *trnD-psbM*, *trnS-trnfM*, *trnH-psbA*, *ndhF*, *rpoB-trnC^{GCA}*, *trnS-trnL*, *rpL16* a *petL-psbE*. Prehľad testovaných lokusov, sekvencie použitých primerov a ich zdroj je súčasťou Tabuľky 2.

Tabuľka 2: Tabuľka uvádzajúca označenie testovaných lokusov, teplotu nasadenia primerov (TA = annealing temperature), označenie použitých primerov a ich zdroj.

Lokus	TA [°C]	Zdroj
Jadrové lokusy		
<i>ppc</i>	55	primer <i>PPCX4F</i> a <i>PPCX5R</i> : Olson 2002
<i>topo6</i>	59	primer <i>top6_2F_305</i> , <i>Top6_3F_464</i> a <i>Top6_8R_1680</i> : Blattner 2016
<i>isi</i>	55	primer <i>isi-ex3F</i> a <i>isi-ex5R</i> : Franck et al. 2012
Chloroplastové lokusy		
<i>rpoB-trnC</i>	54	primer <i>rpoB</i> , <i>trnC^{GCA}R</i> : Shaw et al. 2005
<i>trnD-trnT</i>	54	primer <i>trnD^{GUC}F</i> , <i>trnT^{GGU}</i> : Shaw et al. 2005
<i>trnD-psbM</i>	54	primer <i>trnD^{GUC}R</i> , <i>psbMF</i> : Shaw et al. 2005
<i>psbM-ycf6</i>	54	primer: <i>ycf6F</i> , <i>psbMR</i> : Shaw et al. 2005
<i>trnC-ycf6</i>	54	primer <i>trnC^{GCA}F</i> , <i>ycf6R</i> : Shaw et al. 2005
<i>trnQ-rps16</i>	54	primer <i>trnQ^{UUG}</i> , <i>rpS16x1</i> : Shaw et al. 2007
<i>trnS-trnL</i>	50	primer <i>trnS^{GGA}</i> , <i>trnL^{UAA}R</i> : Shaw et al. 2005
<i>trnS-trnfM</i>	55	primer <i>trnS^{UGA}</i> , <i>trnfM^{CAU}</i> : Shaw et al. 2005
<i>rpL16</i>	50	primer <i>rpL16F71</i> , <i>rpL16R1516</i> : Shaw et al. 2005
<i>rpS16</i>	52	primer <i>rpS16F</i> a <i>rpS16R</i> : Shaw et al. 2005
<i>trnH-psbA</i>	54	primer <i>psbA</i> a <i>trnH</i> : Tate et Simpson 2003
<i>petL-psbE</i>	54	primer <i>petL</i> , <i>psbE</i> : Shaw et al. 2007
<i>ndhF</i>	50	primer <i>ndhF-913_F</i> , <i>ndhF_R</i> : Karis et al. 2001

Pre kontrolu náhodnej kontaminácie komponentov PCR reakcie bola pri každej reakcii použitá jedna vzorka, v ktorej namiesto gDNA bola pridaná destilovaná voda (tzv. negatívna kontrola). Pred prípravou PCR reakcie sa jednotlivé komponenty pridávané do reakcie nechali rozmraziť a následne sa premiešali pomocou vortexu a krátko stočili na stolnej minicentrifúge. Zloženie reakčnej zmesi je popísané v Tabuľke 3. Reakčná zmes na PCR bola pripravená napipetovaním jednotlivých zložiek do jednej 500 µl mikroskúmavky, následným premiešaním na vortexe a stočením na centrifúge. Takto pripravená reakčná zmes bola rozpipetovaná

po 23 µl do vopred označených PCR stripov umiestnených v chladiacom stojane. Následne boli pridané do každej mikroskúmavky s PCR reakčnou zmesou 2 µl gDNA. Po pridaní všetkých zložiek boli PCR stripy s obsahom krátko scentrifugované na stolnej minicentrifúge a vložené do termocyklieru, na ktorom sa spustil príslušný program pre aktuálne testovaný lokus (Tabuľka 4).

Tabuľka 3: Zloženie PCR reakčnej zmesi.

Reagencie	Koncentrácia pracovného roztoku	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku
Deionizovaná voda			18,8 µl
Pufo A*	5 x	1 x	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
Priamy primer	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
Spätný primer	10 µM	0,2 µM	0,5 µl
Taq polymeráza	5 U/µl	1 U	0,2 µl
gDNA	≈ 40 ng	≈ 80 ng	2 µl
Celkový objem			25 µl

Legenda: * - výsledná koncentrácia Mg²⁺ iónov v pufri bola 1,5 mM.

Tabuľka 4: Teplotný program použitý pre PCR reakcie pre testované lokusy.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95 °C	3 min	1
Dodatočná denaturácia	95 °C	30 s	
Annealing (nasadenie primerov)	*	30 s	36
Elongácia	72 °C	30 s	
Konečná elongácia	72 °C	10 min	1
Ukončenie	10 °C	∞	

Legenda: * - teploty nasadenia primerov pre jednotlivé lokusy sú popísané v Tabuľke 2.

4.4.2 Elektroforetická separácia

Produkty PCR amplifikácie boli následne detegované pomocou elektroforetickej separácie v 1,5% agarózovom gély, ktorý bol pripravený zmiešaním 1,5 g agarózy so 100 ml

0,5X TBE pufru v kadinke. Následne bol obsah kadinke rozvarený v mikrovlnnej rúre. Po rozvarení sa nechala zmes mierne ochladiť, boli pridané 2 µl fluorescenčného farbiva (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain) a roztok bol starostlivo premiešaný. Po premiešaní bol gél preliaty do pripravenej elektroforetickej vaničky s hrebeňmi, kde približne 30 minút tuhol pri laboratórnej teplote. Po stuhnutí boli odstránené hrebienky a gél bol premiestnený do elektroforetickej komôrky naplnenej 0,5X TBE pufrom. Do prvej jamky boli napipetované 3 µl štandardu molekulovej hmotnosti HyperLadder™ 100 bp a do ďalších jamiek boli napipetované 3 µl jednotlivých PCR produktov. Pred samotným naneseným vzoriek do gélu bola každá vzorka dodatočne zmiešaná s 1 µl nanášacieho pufu (5X DNA Red Loading Buffer). Po napipetovaní vzoriek bola spustená elektroforetická separácia pri napätí 80 V po dobu 30 minút. Následne po separácii boli vzorky vizualizované a dokumentované pomocou UV dokumentačného systému UVI-1D (UVITEC).

4.4.3 Purifikácia PCR produktov pred sekvenovaním

V prípade, že bol výsledok PCR amplifikácie pozitívny a negatívna kontrola nenasvedčovala nožnej kontaminácii, vykonala sa purifikácia vzoriek precipitáciou pomocou 20% polyetylén glykolu (PEG), čím sa odstránili zvyšky nespotrebovaných primerov a nukleotidov. V prvom kroku sa k PCR produktu pridal rovnaký objem PEG roztoku (teda 22 µl) a obsah skúmavky sa jemne premiešal opakovaným nasatím vzorky pipetou. Následne vzorky jednu hodinu precipitovali pri laboratórnej teplote. Po uplynutí jednej hodiny boli vzorky centrifugované po dobu 25 minút pri 3 700 otáčkach. Vzniknutý supernatant bol odpipetovaný a produkt premytý 40 µl 70% etanolu. Nasledovala 15 minútová centrifugácia pri 3 700 otáčkach. Supernatant bol odpipetovaný, vyzrážaný pelet vysušený vo vákuovej sušičke a následne rozpustený v 20 µl destilovanej vody. Takto prečistené vzorky boli uchované pri teplote -20 °C do ďalšieho spracovania. Pred odoslaním vzoriek na sekvenovanie bolo nutné vykonať ich úpravu zmiešaním 5 µl vzorky s 5 µl sekvenačného primeru (Tabuľka 2) a rozpipetovaním do 96-jamkovej PCR doštičky. Všetky vzorky boli sekvenované pomocou priameho aj spätného primeru použitých pri PCR reakcii. Takto pripravené vzorky boli odoslané na komerčné sekvenovanie do firmy Macrogen (Macrogen, Južná Kórea).

4.4.4 Bioinformatická analýza

Výstupy zo Sangerovho sekvenovania boli upravené pomocou programu BioEdit (orezanie nečitateľného začiatku a konca sekvencií). Porovnaním priamej a spätnej sekvencie bola vytvorená konsenzuálna sekvencia, ktorá bola následne analyzovaná pomocou programu MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) vytvorením mnohopočetného zarovnania pomocou algoritmu ClustalW. V prípade, že bola zistená medzidruhovú variabilita v danom lokuse, skúmaný lokus bol označený a bude využitý v ďalšej práci. V opačnom prípade bol lokus vyradený z ďalšieho použitia.

5 VÝSLEDKY

V rámci experimentálnej časti bakalárskej práce boli otestované 3 jadrové a 13 chloroplastových lokusov na ôsmich vzorkách predstavujúcich tri základné taxóny agregátu *P. vulgaris* (*P. bohemica*, *P. vulgaris* s. str., *P. vulgaris* var. *bicolor*) pochádzajúcich z územia Nórska a Slovenskej a Českej republiky. Prehľad výsledkov testovaných lokusov je súčasťou Tabuľky 5.

Tabuľka 5: Výsledky testovania jednotlivých jadrových a chloroplastových lokusov.

Lokus	Výsledok	Dĺžka výsledného zarovnania [bp]	Pozorovaný polymorfizmus	Poznámka
Jadrové lokusy				
<i>PPC</i>	+	n.a.	n.a.	zmesný signál
<i>topo6</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>isi</i>	+	n.a.	n.a.	zmesný signál
Chloroplastové lokusy				
<i>psbM-ycf6</i>	+	917	1 SNP (A/G)	špecifický znak, VU vs. BO
<i>trnC-ycf6</i>	+	795	1 SNP (polyT) +1 SNP (T/G)	špecifický znak, VU vs. BO + nešpecifický, VU
<i>trnQ-rps16</i>	+	448	7 bp inzert + 1SNP (polyT)	špecifický znak, VU vs. BO
<i>rpS16</i>	+	738	1 SNP (polyT)	špecifický znak, VU vs. BO
<i>trnD-trnT</i>	+	827	0	n.a.
<i>trnD-psbM</i>	+	590	0	n.a.
<i>trnS-trnfM</i>	+	978	0	n.a.
<i>trnH-psbA</i>	+	300	0	n.a.
<i>ndhF</i>	+	913	0	n.a.
<i>rpoB-trnC^{GCA}</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>trnS-trnL</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>rpL16</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.
<i>petL-psbE</i>	-	n.a.	n.a.	n.a.

Legenda: + - úspešná amplifikácia; - - neúspešná amplifikácia; bp - počet nukleotidových párov (base pair); n.a. - nehodnotený; SNP - jednonukleotidový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism); VU - označenie pre *Pinguicula vulgaris* s. str. a *P. vulgaris* var. *bicolor*; BO - označenie pre *P. bohemica*.

Z testovaných jadrových lokusov sa podarilo úspešne amplifikovať len lokus *ppc* a *isi* vo všetkých vzorkách, ktorých produkt po elektroforetickej separácii na agarózovom gély predstavoval jeden výrazný pruh. Ich sekvenovanie však nebolo úspešné, nakoľko všetky sekvencie boli nečitateľné z dôvodu zmesného signálu. Naopak, lokus *topo6* sa nepodarilo úspešne amplifikovať na žiadnej z použitých vzoriek.

Zo skúmaných chloroplastových lokusov sa podarilo úspešne amplifikovať deväť, ďalšie štyri neboli úspešne amplifikované na všetkých vzorkách. Konkrétne sa jednalo o lokusy *rpoB-trnC*, *trnS-trnL*, *rpL16* a *petL-psbE*. V piatich lokusoch (*trnD-trnT*, *trnD-psbM*, *trnS-trnfM*, *trnH-psbA* a *ndhF*) s priemernou dĺžkou zarovnania 722 bázových párov nebol pozorovaný žiadny polymorfizmus medzi použitými vzorkami. V prípade ďalších štyroch lokusov bol pozorovaný polymorfizmus. V prípade chloroplastového lokusu *psbM-ycf6* bol pozorovaný jednonukleotidový polymorfizmus, a jednalo sa o druhovo špecifický znak, ktorý odlišoval tučnicu českú od tučnice obyčajnej a tučnice obyčajnej dvojfarebnej. V pozícii 796 výsledného zarovnania bol v testovaných vzorkách tučnice českej prítomný adenín, zatiaľ čo u zvyšných vzoriek bol v tejto pozícii pozorovaný nukleotid guanín. Aj u ďalších troch lokusov bol detegovaný polymorfizmus, so špecifickým znakom odlišujúcim *P. bohemica* od *Pinguicula vulgaris* s. str. a *P. vulgaris* var. *bicolor*. Lokusy *trnC-ycf6* a *rpS16* obsahovali jednonukleotidový polymorfizmus v tzv. poly-T úseku. Lokus *trnQ-rps16* obsahoval inzert s dĺžkou 7 bp a jednonukleotidový polymorfizmus znovu v poly-T oblasti. Lokus *trnC-ycf6* obsahoval navyše druhovo nešpecifický jednonukleotidový polymorfizmus v pozícii 560 výsledného zarovnania, kedy u dvoch vzoriek tučnice obyčajnej z Nórska (VU_NOR_2a, VU_NOR_2d) sa v tejto pozícii nachádzal guanín, zatiaľ čo u všetkých ostatných vzoriek bol prítomný tymín.

6 DISKUSIA

Cieľom bakalárskej práce bolo nájsť polymorfné chloroplastové a jadrové markre, ktoré by mohli byť využité pri rozlíšení taxónu *P. bohemica* od ostatných taxónov v agregáte: *P. vulgaris* s. str. a *P. vulgaris* var. *bicolor*.

V prípade dvoch úspešne amplifikovaných jadrových lokusov (*ppc* a *isi*), ktoré po sekvenovaní nebolo možné vyhodnotiť pre zmesný signál, došlo zrejme k amplifikácii viacerých lokusov. Aj keď tieto lokusy predstavujú tzv. „low copy nuclear genes“, teda gény s malým počtom kópií v genóme, je pravdepodobné, že v genóme skúmaných taxónov rodu *Pinguicula* sa tieto gény nachádzajú vo viacerých odlišných kópiách líšiacich sa pravdepodobne len malým niekoľko nukleotidovým posunom, čo sa prejavilo nečitateľnou zmesnou sekvenciou. Keďže skúmané taxóny predstavujú vysoké polyploidy s počtom chromozómov $2n = 8x = 64$, je táto možnosť viac než pravdepodobná. Ďalším vysvetlením pre zmesnú sekvenciu môže byť fakt, že použité primery nie sú dostatočne špecifické a amplifikujú niekoľko odlišných lokusov. V tomto prípade by sa však dalo očakávať viacero produktov výrazne sa líšiacich dĺžkou amplifikovaného produktu. Nakoľko na agarózovom gély bol pre obidva lokusy pozorovaný len jeden jasný pruh, toto vysvetlenie sa zdá byť menej pravdepodobné. Bez ďalšieho testovania nie je však možné vylúčiť ani túto možnosť. Tieto dva lokusy (*ppc* a *isi*) neboli preto vylúčené z ďalšieho testovania a budú rozklonované, aby bolo možné zistiť príčinu zmesného signálu.

V prípade štyroch chloroplastových lokusov (*psbM-ycf6*, *trnC-ycf6*, *trnQ-rps16* a *rpS16*), pri ktorých bol pozorovaný polymorfizmus sa vo všetkých štyroch prípadoch jednalo o špecifický znak, ktorý odlišoval taxóny *P. bohemica* od *P. vulgaris* s. str. a *P. vulgaris* var. *bicolor*. Nakoľko v tejto práci sa pracovalo len s ôsmimi vzorkami, použiteľnosť týchto markrov bude nutné podporiť otestovaním celého setu vzoriek, ktorý obsahuje taxón tučnice obyčajnej z viacerých častí Európy ako aj ďalšie blízko príbuzné druhy. Až po otestovaní na celom sete bude jasné, či sú tieto polymorfné znaky druhovo špecifické. Existuje totiž stále možnosť, že znaky odlišujúce *P. bohemica* v testovacej sade vzoriek môžu byť prítomné aj v taxóne *P. vulgaris*, alebo inom príbuznom taxóne, v inej časti celkového areálu *P. vulgaris* agg. než predstavovali zahrnuté vzorky.

Z týchto štyroch chloroplastových lokusov je pre ďalšie použitie jednoznačne najvhodnejší lokus *trnQ-rps16* s detegovaným 7 bp inzertom charakteristickým pre tučnicu českú a úsek *psbM-ycf6*. Ostatné pozorované polymorfizmy nemajú až takú váhu na prípadné taxonomické závery, nakoľko sa jedná o znaky v poly-T úsekoch. V takýchto miestach DNA, teda miestach, kde za sebou nasleduje jeden typ nukleotidu vo veľkom počte, môže dôjsť

k pridaniu respektíve ubratu jedného alebo viacerých nukleotidov, a teda k vzniku polymorfizmu veľmi ľahko počas replikácie DNA (ale aj počas PCR reakcie) pri tzv. „pošmyknutí sa polymerázy“. Kontrola novo-syntetizovaného vlákna je sťažená opakovaním sa jedného typu nukleotidu a nie je veľmi efektívna. V tomto prípade však možno vylúčiť chybu polymerázy ako zdroja pozorovaného polymorfizmu, nakoľko pozorované polymorfne miesta sa vždy vyskytovali u všetkých testovaných vzoriek konzistentne. V prípade, že by zdrojom takéhoto polymorfizmu bolo „pošmyknutie sa polymerázy“ počas PCR reakcie (teda chyba polymerázy), očakával by sa náhodný výskyt takéhoto polymorfizmu a nie druhovo špecifický, aký bol pozorovaný.

7 ZÁVER

Na základe výsledkov je evidentné, že tučnica česká, tučnica obyčajná a tučnica obyčajná dvojfarebná sú veľmi blízko príbuzné, nakoľko aj napriek testovaniu veľkého počtu molekulárnych markrov, sa nepodarilo odhaliť výraznejšie rozdiely v získaných sekvenciách.

Lokusy, u ktorých sa prejavil polymorfizmus bude potrebné otestovať na väčšom počte vzoriek z ďalších častí Európy, nakoľko v rámci bakalárskej práce bolo spracovaných iba osem vzoriek. V prípade, že sa pri podrobnejšom skúmaní znak prejaví ako dostatočne špecifický pre tučnicu českú, bude možné na základe získaných výsledkov vyvodiť určité taxonomické závery.

8 LITERATÚRA

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617–631.

Ahn S., Tanksley S. D. (1993): Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7980–7984.

Avise J. C. (2004): *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA.

Baes P., Cutsem P. (1993): Electrophoretic Analysis of Eleven Isozyme Systems and their Possible Use as Biochemical Markers in Breeding of Chicory (*Cichorium intybus* L.). *Plant Breeding* 110: 16–23.

Bělohávková R. (2000): *Pinguicula* L. – tučnice. In: Slavík, B. (ed.), *Květena České republiky* 6. Academia, Praha.

Bělohávková R. (1989): Tučnice česká – *Pinguicula bohemica* Krajina. In: Slavík B. (ed.), *Vybrané ohrožené druhy flory ČSSR. Studie ČSAV* 10: 81–93.

Bernátová D. (2010): K premenlivosti *Pinguicula vulgaris* v Západných Karpatoch na území Slovenska. *Bulletin Slovenskej botanickej spoločnosti* 32 (2): 175–181.

Blattner F. R. (2015): *TOPO6*: a nuclear single-copy gene for plant phylogenetic inference. *Plant Systematics and Evolution* 302: 239–244.

Casper S. J. (1962): Revision der Gattung *Pinguicula* in Eurasien. *Feddes Repertorium Beihefte* 66: 1–148.

Casper S. J. (1966): Monographie der Gattung *Pinguicula* L. *Bibliotheca Botanica* 127/128: 1–209.

Casper S. J., Stimper R. (2009): Chromosome numbers in *Pinguicula* (Lentibulariaceae): survey, atlas, and taxonomic conclusions. *Plant Systematics and Evolution* 277: 21–60.

De Candolle A. P. (1844): *Prodromus systematis naturalis regnis regni vegetabilis* VII. S. G. Mason, Paris, France.

Degtjareva G. V., Casper S. J., Hellwing F. H., Schmidt A. R., Steiger J., Sokolff D. D. (2006): Morphology and nrITS Phylogeny of the Genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae), with Special Attention to Embryo Evolution. *Plant Biology* 8 (6): 778–790.

- Domin K. (1936): *Plantarum Čechoslovakiae enumeration species vasculares indigenas et introductas exhibens*. Preslia 13 (15): 1–305.
- Dostál J. (1950): Květena ČSR a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin Díl II, část 2, 3. Praha.
- Dostál J. (1958): Klíč k úplné květeně ČSR. ČSAV, Praha.
- Edwards D., Batley J. (2010): Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal* 8 (1): 2–9.
- Ernst A. (1961): Revision der Gattung *Pinguicula*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 80: 145–194.
- Franck A. R., Cochrane B. J., Garey J. R. (2012): Low-copy nuclear primers and *ycf1* primers in Cactaceae. *American Journal of Botany*.
- Gupta P., Varshney R. K., Sharma P. C., Ramesh B. (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369–390.
- Hadačová V., Ondřej M. (1972): Isoenzymy. *Biologické listy* 37: 1–25.
- Hudson R. R., Bailey K., Skarecky D., Kwiatowski J., Ayala F. J. (1994): Evidence for positive selection in the superoxide dismutase (Sod) region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136: 1329–1340.
- Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevschi A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381.
- Jones N., Ougham H., Thomas H., Pašakinskienė I. (2009): Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183 (4): 935–966.
- Karis P. O., Eldenäs P., Källersjö M. (2001): New evidence for the systematic position of *Gundelia* L. with notes on delimitation of Arctoteae (Asteraceae). *Taxon* 50: 105–114.
- Karp A., Seberg O., Buiatti M. (1996): Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78 (2): 143–149.

Klika J. (1947): Rostlinosociologické jednotky slatin a lučních porostů v Polabí. Vestník Královské České Společnosti Nauk, Praha, 1945/I: 1–31.

Krahulcová A., Jarolimova V. (1991): Relationship between *Pinguicula bohemica* Krajina and *Pinguicula vulgaris* L. (Lentibulariaceae) from the kryological point of view. Preslia 53: 323–328.

Krajina V. (1927): *Pinguicula bohemica* Krajina. Věstník Královské České Společnosti Nauk, Třída mathematicko-přírodovědecká 1926/15: 3–13.

Kubát K. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.

Lateef D. (2015): DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements. Journal of Biosciences and Medicines 3: 7–18.

Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology 11: 2453–2465.

Linné C. (1753): *Systema vegetabilium: secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus et differentiis*. Christ, Dieterich.

Ministerstvo životního prostředí. [online] [navštívené 20.3.2019] Dostupné z https://www.mzp.cz/cz/zvlaste_chranene_druhy

Neumann L. M. (1901): Sveriges flora. Gleerup, Lund, Sweden.

Nicod J. C., Largiadier C. R. (2003): SNPs by AFLP (SBA): a rapid SNP isolation strategy for non-model organisms. Nucleic Acids Research 31 (5): 19.

Olson M. E. (2002): Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). Systematic Botany 27: 55–73.

Piola F., Rohr R., Heizmann P. (1999): Rapid detection of genetic variation within and among in vitro propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. Plant Science 141 (2): 159–163.

Pladias – databáze české flóry a vegetace. [online] [navštívené 1.7.2020] Dostupné z <https://pladias.cz/>

Roccia A., Gluch O., Lampard S., Robinson A., Fleischmann A., McPherson S., Legendre L., Partrat E., Temple P. (2016): *Pinguicula* of the Temperate North. Redfern, Dorset, UK.

Rodondi G., Beretta M., Andreis C. (2010): Pollen morphology of alpine butterworts (*Pinguicula* L., Lentibulariaceae). Review of Palaeobotany and Palynology 162: 1–10.

Řepková J., Relichová E. (2001): Molekulární markery, pp 64–69, Atlantis, Brno.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 74 (12): 5463–5467.

Savelkoul P., Aarts H. J. M., Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Lenstra J. (1999): Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. Journal of Clinical Microbiology 37 (10): 3083–3091.

Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Sirpin K. C., Winder C. T., Schilling E. E., Small R. L. (2005): The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany 92: 142–166.

Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E., Small R. L. (2007): Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. American Journal of Botany 94: 275–288.

Skalický V. (1988): Regionálně fytogeografické členění. In: Hejný S., Slavík B. (ed.), Květena ČSR I., pp. 103–121, Academia, Praha.

Soltis D. E., Soltis P. S. (1989): Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Southern E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98 (3): 503–517.

Squirrell J., Hollingsworth P. M., Woodhead M., Russell J., Lowe A. J., Gibby M., Powell W. (2003): How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? Molecular Ecology 12 (6): 1339–1348.

Staub J. E., Meglic V. (1993): Molecular genetic markers and cultivar discrimination: a case study in cucumber. Horticultural Technology 3: 291–300.

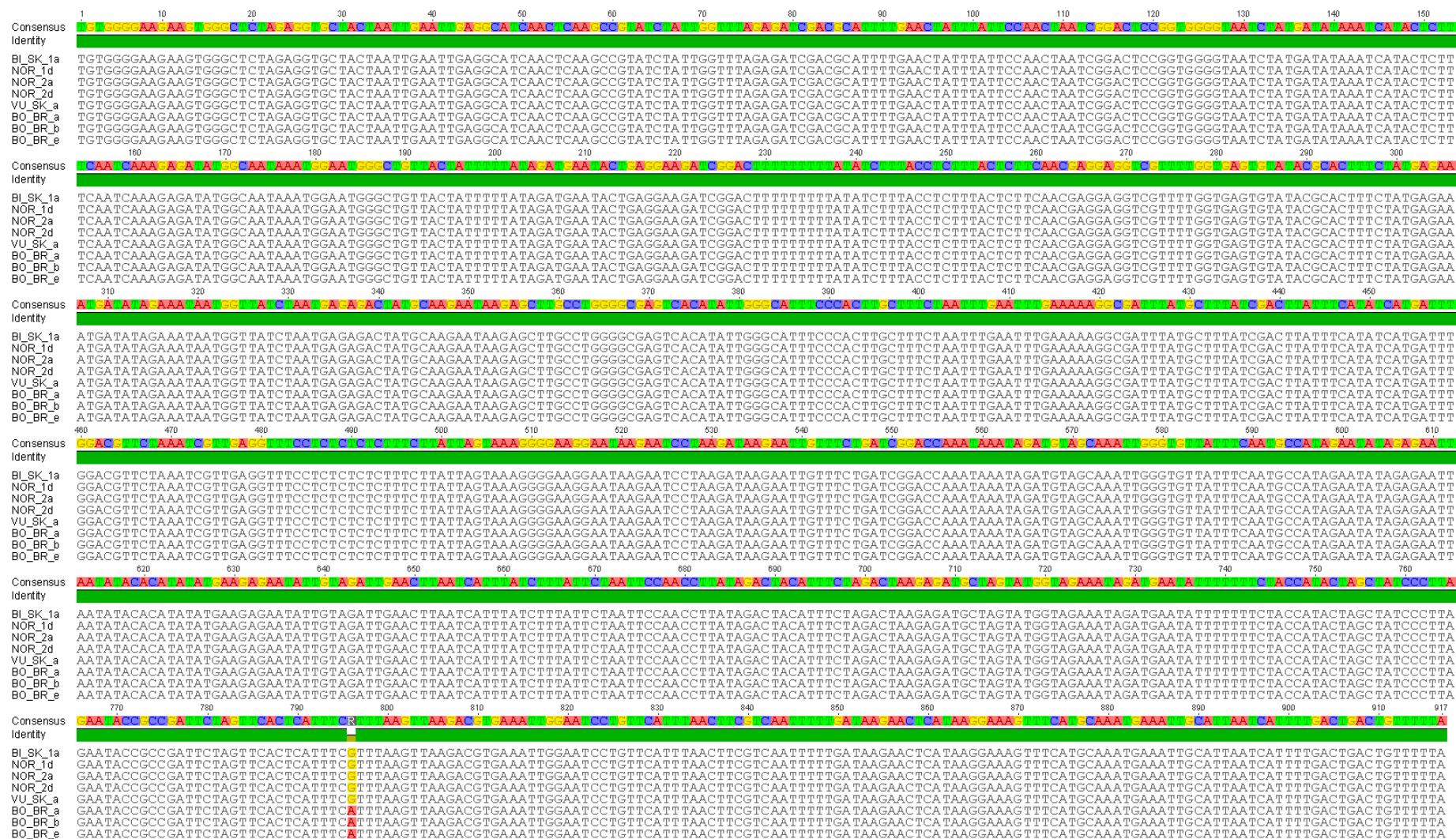
Studnička M. (1986): Tučnice I. Živa 3: 90–91.

Studnička M. (1986): Záchrana *Pinguicula bohemica* Krajina posilováním přírodní populace. In: Problematika záchrany ohrožených druhů rostlin, pp. 96–102, Praha.

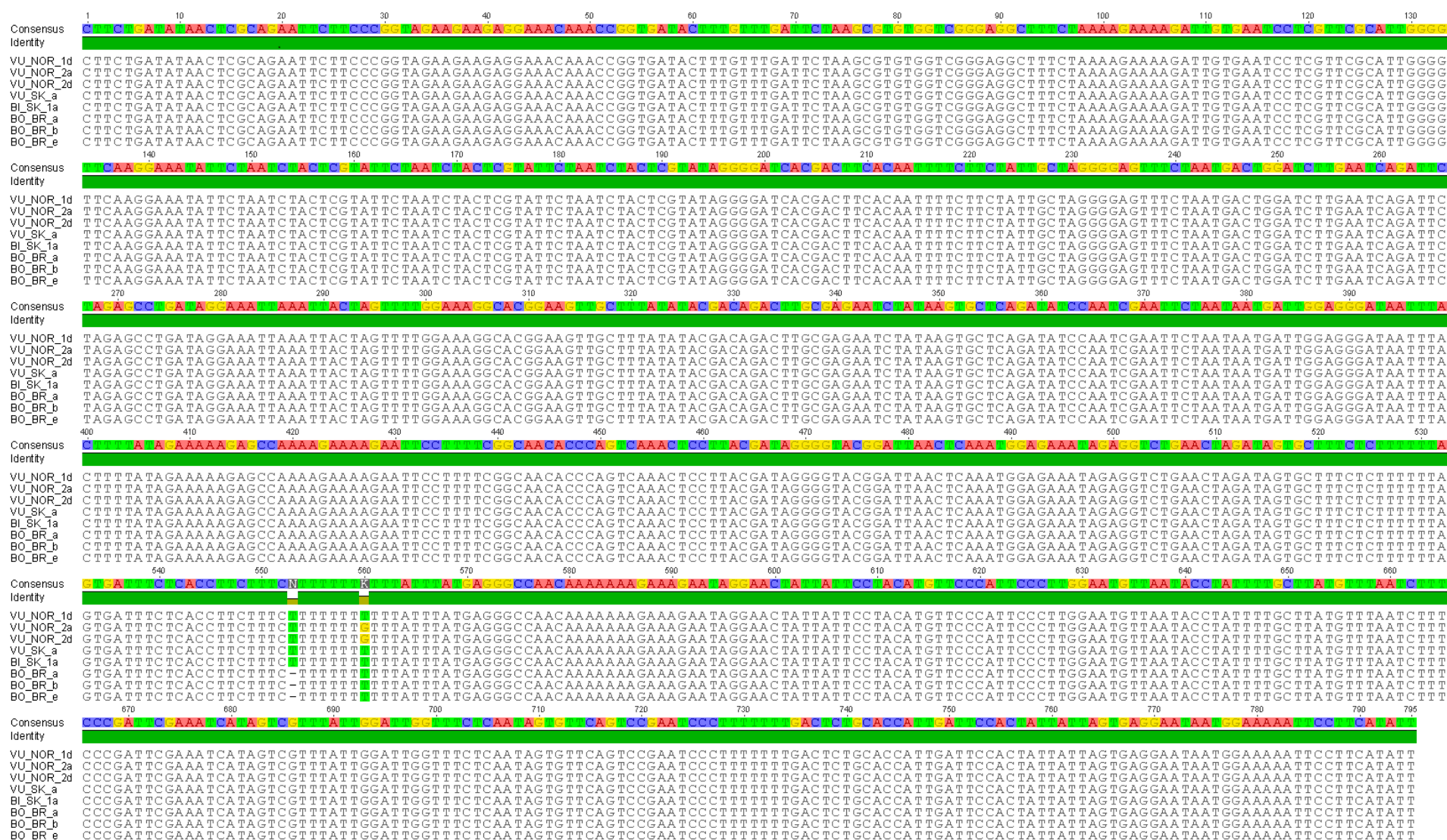
- Studnička M. (1989): Studie kriticky ohroženého druhu *Pinguicula bohemica* se zřetelem na možnosti jeho záchrany. Thesis, Botanický Ústav AVČR Průhonice, Praha.
- Studnička M. (2006): Masožravé rostliny: objekt badatelů, dobrodruhů a snílků. Academia, Praha.
- Studnička M., Hejný S. (1992): Does *Pinguicula bohemica* exist? Carnivorous Plant Newsletter 21 (3): 64–67.
- Sun C., Wang X., Li Z., Yoshimura A., Iwata N. (2001): Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) using RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 102: 157.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar, S. (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30 (12): 2725–2729.
- Tate J. A., Simpson B. B. (2003): Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. Systematic Botany 28: 723–737.
- Vallejos C. E. (1983): Enzyme Activity Staining. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A, pp. 469-515, Elsevier, Amsterdam.
- Válová L. (2010): Rod tučnice (*Pinguicula*) v České republice. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Válová L. (2013): Studie taxonomického komplexu *Pinguicula vulgaris* za použití AFLP markerů a průtokové cytometrie se zaměřením na středoevropské taxony. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Varshney P. K., Graner A. (2013): Cereal genomics II., pp. 161–179, Springer, Berlin.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T. van de, Hornes M., Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407–4414.
- Weising K., Nybom H., Wollf K., Kahl G. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd edn.. Boca Raton, CRC Press, Oxford.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531–6535.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20 (2): 176–183.

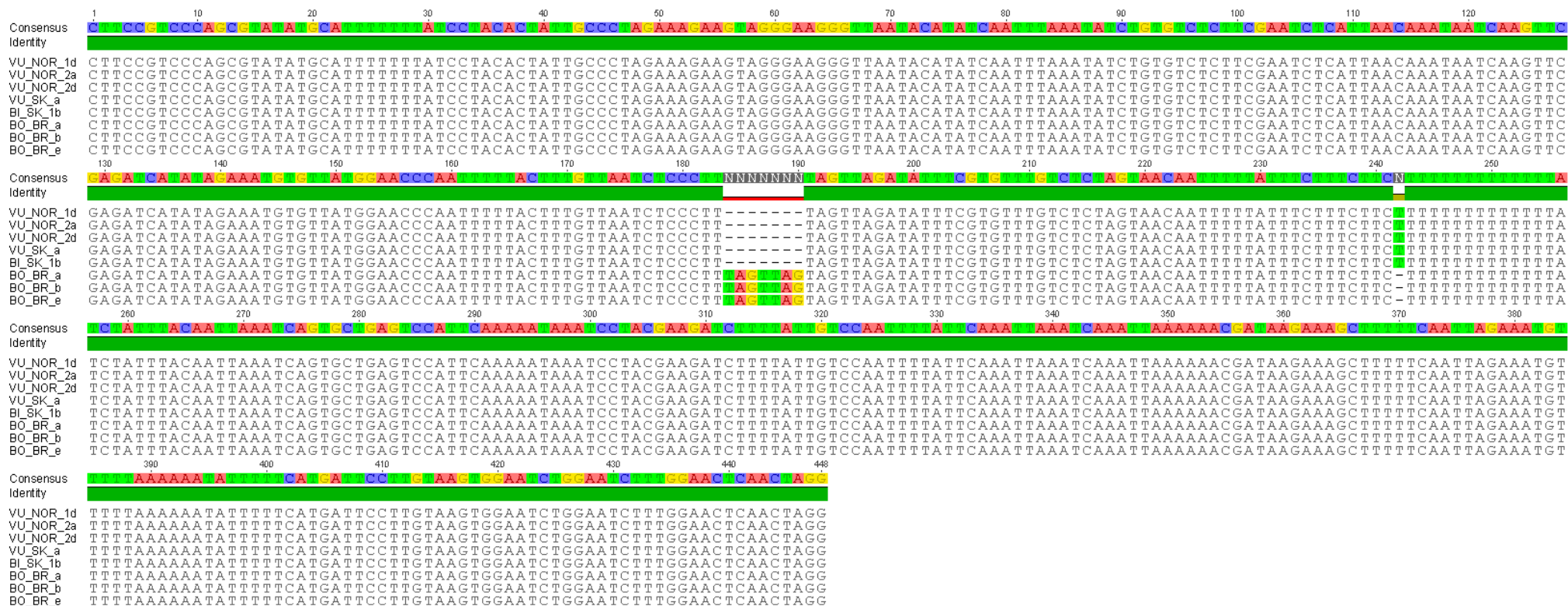
9 PRÍLOHY



Obrázok 1: Výsledné zarovnanie sekvencie lokusu psbM-ycf6 (pozorované variabilné pozície sú zvýraznené farebne).



Obrázok 2: Výsledné zarovnanie sekvencie lokusu trnC-ycf6 (pozorované variabilné pozície sú zvýraznené farebne).



Obrázok 3: Výsledné zarovnanie sekvencie lokusu trnQ-rps16 (pozorované variabilné pozície sú zvýraznené farebne).