

VARIABILITY OF MICROSATELLITE MARKERS IN GENUS THYMUS

VARIABILITA MIKROSATELITNÍCH MARKERŮ U RODU THYMUS

¹Vašíčková Š., ¹Vejl P., ²Dušková E., ²Dušek K., ¹Čílová D., ¹Vašek J.

¹ Department of Genetics and Breeding, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbátov, Czech Republic

² Crop Research Institute, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc – Holice, Czech Republic

E-mail: vasickovas@af.czu.cz , vejl@af.czu.cz, dusek@genobanka.cz

ABSTRACT

The genus *Thymus* (*Lamiaceae*) is taxonomically a very complex genus with a high frequency of hybridization and introgression among sympatric species. Co-dominant molecular markers provide an important tool for studies on mating patterns and breeding systems. Here we evaluated genetic diversity of different *Thymus* species (*Thymus serpyllum* L. emend. Miller, *Thymus praecox* Opiz., *Thymus pulegioides* L., *Thymus pulegioides* L. subsp. *chamaedrys* (Fries) Gusul., *Thymus valesciacus*, *Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* (Lyka) P. A. Schmidt) by using 3 co-dominant SSR markers pursuant witch we analyzed locus E089, D347 and D257. It was detected 36 polymorphic alleles in 37 plants. The frequency of polymorphic alleles for each species population was obtained. In 3 individual plants we established more than 2 alleles at least in one locus. Similarity relationships between populations were described graphically by a dendrogram, which clustered the three populations with the TFPGA (tools for population genetic analysis) program (Miller). The statistical relation between population size and the number of polymorphic alleles was verified.

Key words: SSR, genetic diversity, *Thymus*, TFPGA.

Acknowledgments: This work was supported by the grant from Czech university of Life science Prague in project “Molecular characterization and *in vitro* cultivation of genus *Thymus* and *Plantago*”. We would also like to acknowledge Crop Research Institute, Division of Vegetables and Special Crops – Olomouc, which took part with project number NAZV : EP 7199 “Selection of native medicinal and aromatic ecotypes, the propagation technology recommendation and introduction into chosen localities”.

ÚVOD

Rod *Thymus* patří mezi léčivé rostliny známé, cíleně pěstované a využívané od antických dob (STAHL-BISKUPS & SAÉZ, 2002). Dlouhodobě byl komerčně využíván nejen pro léčebné účinky v humánní medicíně, ale také ke konzervování potravin a jako kuchyňské koření (CASTLEMAN, 2004). Obsah účinných látek, zejména silice a v ní obsažených složek thymol, karvakrol, linalool, p-cymene, borneol, geraniol předurčují antiseptické účinky. Rod *Thymus* je rozšířený po celém světě, zejména ve Středomoří (SLAVÍK, 2000). Zahrnuje téměř 350 druhů, ale pouze pět z nich jsou významné z hlediska komerčního využití (LAWRENCE & TUCKER, 2002). I v naší flóře je zastoupen hojně, zejména druhy *Thymus vulgaris* L., *Thymus pulegioides* L., *Thymus alpestris* Tausch ex A.J.Kerner, *Thymus serpyllum* L. emend. Miller, *Thymus praecox* Opiz. a další (DOSTÁL, 1989). Mezi zástupci tohoto rodu můžeme nalézt rostliny polyploidní i gynodioické (BRIGGS a WALTERS, 2001). Empirické studie založené na pozorování polyploidů vyžadují znalosti jejich způsobu dědičnosti. Druhy s předpokládaným allopolyploidním původem vykazují disomickou dědičnost, při které je segregace chromozomů stejná jako u nehomologních párů chromozomů u diploida. Naproti tomu, autopolyploidie formují během meiózy multivalenty, z čehož vyplývá polysomická dědičnost (LANDERGOTT et al., 2006). V poslední době byla zaměřena pozornost na evoluci pohlavních rozmnožovacích systémů a na efekty spojené s polyploidizací, změnami v kompatibilitě, určení pohlaví a inbrední depresi (PANNELL, 2004). Jako vhodný molekulární genetický nástroj pro studium složitých rozmnožovacích systémů a spontánních křížení se jeví použití kodominantních mikrosatelitních markerů s vysokou diverzitou alel (BERGLUND et al., 2006). Mikrosatelitní DNA (SSR – Simple Sequence Repeat) jsou krátké (1-5 bp), uniformě se opakující motivy nukleotidů v počtu několika desítek až tisíců párů bází. Markery založené na mikrosatelitech mají řadu předností, mezi něž patří vysoký stupeň polymorfismu (LI et al., 2002), rovnoměrné zastoupení v celém genomu (JAKŠE et al., 2001), vykazují kodominanci a vyžadují nepatrné množství analyzované DNA.

MATERIÁL A METODIKA

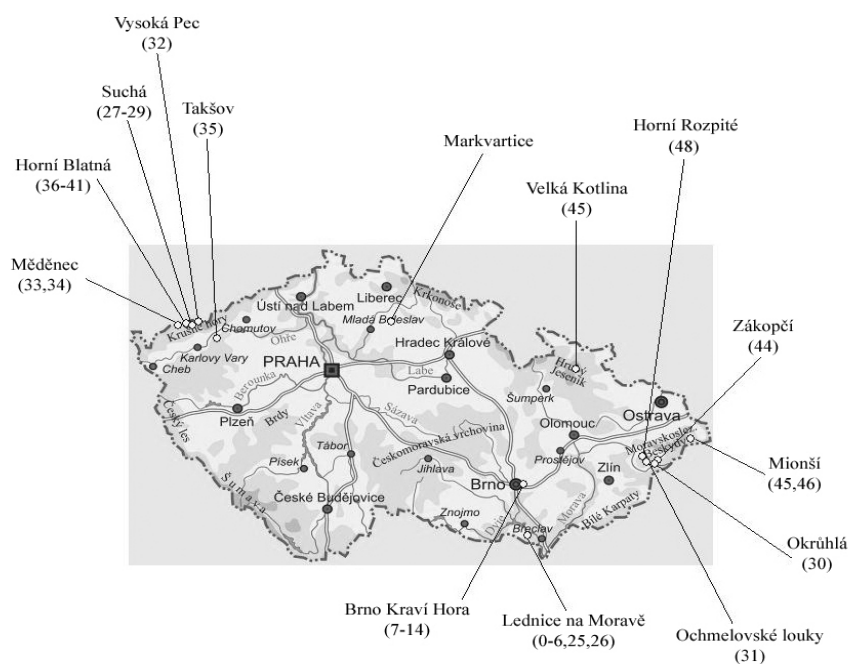
Rostlinný materiál

Bylo hodnoceno 37 genotypů, jejichž původ a označení uvádí Tab. 1 a Obr.1. Zástupci jednotlivých druhů byli odebráni z kolekce rodu *Thymus*, která je udržovaná na pracovišti VÚRV, v.v.i., Oddělení zelenin a speciálních plodin Olomouc, která vznikala postupně v rámci sběrových expedic při řešení projektů NAZV: "Mapování, konzervace a monitorování genofondu mizejících krajových forem kulturních rostlin a jejich planých příbuzných druhů", "Výběr ekotypů domácích léčivých a kořeninových rostlin" a individuálních, které měly za cíl soustředit rostlinný i semenný materiál z přesně určené lokality v ČR. Navštívené lokality se přesně zaměřovaly pomocí navigace GPS, takže se dají zpětně navštívit a identifikovat včetně možnosti opakovaných odběrů vegetativních i generativních částí vytipovaných genotypů rodu *Thymus*. Jednotlivé druhy byly taxonomicky zařazeny botanikem Jaroslavem Čápem v roce 2000. Od té doby jsou uchovávány v polní kolekci bez izolátorů.

Tab. 1 Původ a označení jednotlivých druhů rodu *Thymus*

Název	Číslo vzorku	Lokalita
<i>Thymus valesciacus</i> (2n = ?)	0-6	MZLU, Lednice na Moravě- Osivo získáno od holandské firmy Mark Plaza
<i>Thymus pulegioides</i> L. subsp. <i>chamaedrys</i> (Fries) Gusul. (2n = 28)	7-14	MZLU, Lednice na Moravě- Osivo získáno ze Střediska léčivých rostlin LF MU na Kraví Hoře v Brně
<i>T.praecox</i> Opiz (2n = 54)	25,26	MZLU, Lednice na Moravě
<i>T.pulegioides</i> L. (2n = 28)	33,34	Sběr-Krušné Hory 1998, Měděnec
<i>T.pulegioides</i> L. (2n = 28)	36-41	Sběr- Krušné hory 1998, Horní Blatná
<i>T.serpyllum</i> L. emend. Miller (2n = 24)	27-29	Sběr-Krušné Hory 1998, Suchá
<i>T. pulegioides</i> L. (2n = 28)	35	Sběr-Krušné Hory 1998, Doupovské vrchy, Takšov
<i>T.pulegioides</i> L. (2n = 28)	31	Sběr-BESKYDY 1999, Vsetínské vrchy, Ochmelovské louky
<i>T.pulegioides</i> L. (2n = 28)	30	Sběr- BESKYDY 1999 ,Vsetínské vrchy, Okružlá
<i>T. pulegioides</i> L. (2n = 28)	44	Sběr- BESKYDY 1999,Vsetínské vrchy, Zákopčí
<i>T. pulegioides</i> L. (2n = 28)	46,47	Sběr-BESKYDY 1999,Moravskoslezské Beskydy, Mionší
<i>T. pulegioides</i> L. (2n = 28)	48	Sběr-BESKYDY 1999,Moravskoslezské Beskydy,Horní Rozpité
<i>Thymus pulcherrimus</i> subsp. <i>sudeticus</i> (Lyka) P. A. Schmidt (2n = 30)	45	Sběr- JESENÍKY 2000, Velká Kotlina
<i>T.pulegioides</i> L. (2n = 28)	32	Sběr-Krušné hory 1998, Vysoká Pec

Obr 1. Původní lokality hodnocených zástupců rodu *Thymus*



Izolace, amplifikace a separace DNA

Izolace byla provedena pomocí izolační sady DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo). Z důvodu vysokého obsahu inhibičních látek byl postup byl modifikován dle LANDERGOTTA *et al.* (2006). Variabilita byla testována pomocí tří mikrosatelitních markerů navržených LANDERGOTTEM *et al.* (2006) pro druh *Thymus praecox* Opiz. Byla hodnocena variabilita lokusů D347, D257, E089. Optimalizovaná PCR amplifikace probíhala následovně:

Mikrosatelitní marker E089 - reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 2 ng genomické DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg hovězího albuminu BSA (Sigma). Koncentrace ostatních komponent reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08 % Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 0,16 mM dNTP, 0,7 µM primer E089-F, 0,2 µM primer E089-R, 0,2 mM tetramethyl amonium oxalát (TopBio).

Mikrosatelitní marker D257 - reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 2 ng genomické DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg hovězího albuminu BSA (Sigma). Koncentrace ostatních komponent reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08 % Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 0,16 mM dNTP, 0,6 µM primer D257-F, 0,2 µM primer D257-R, 0,2 mM tetramethyl amonium oxalát (TopBio).

Mikrosatelitní marker D347 - reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 2 ng genomické DNA, 0,5 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg hovězího albuminu BSA (Sigma). Koncentrace ostatních komponent reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08 % Nonidet P40, 1,8 mM MgCl₂, 0,16 mM dNTP, 1,1 µM primer D347-F, 0,7 µM primer D347-R, 0,2 mM tetramethyl amonium oxalát (TopBio).

Amplifikace markerů proběhla v termocykleru DNA Engine (Bio-Rad, USA) v těchto krocích: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 3 minut, 35 cyklů se opakovaly fáze denaturace při 94 °C 35 s, annealingu při 57,5 °C 85 s pro lokus D257, při 51 °C 85 s pro lokus D347 a 46 °C 65 s pro E 089 a následovala osmi sekundová elongace při 72 °C pro D257 a E089, a čtrnácti sekundová elongace pro D347. Finální elongace proběhla při 72 °C a trvala 15 minut. Optimální annelační teplota každého primeru byla zjišťována pomocí teplotního gradientu. Separace vzorků byla provedena na vertikální elektroforetické cele Sequi – Gene II (Bio-Rad, USA) v 6% denaturačním akrylamidovém gelu (8M močovina) v 1x TBE pufru. Amplifikované vzorky byly upraveny dle BENBOUZA *et al.* (2006) a podrobeny denuraci po dobu 5 minut při 94 °C. Separace vzorků probíhala 1,5h při 70 W. Po obarvení dle BENBOUZA *et al.* (2006) byl výsledek zdokumentován a digitalizován pomocí scanneru HP scanjet 4500c (Hewlett-Packard, USA).

Statistické vyhodnocení

Deskriptivní statistika populací byla provedena pomocí programu TFGA (Tools For Population Genetic Analyses) ver.1.3. Konstrukce dendrogramu byla provedena na základě algoritmu, který publikoval ROGER (1972).

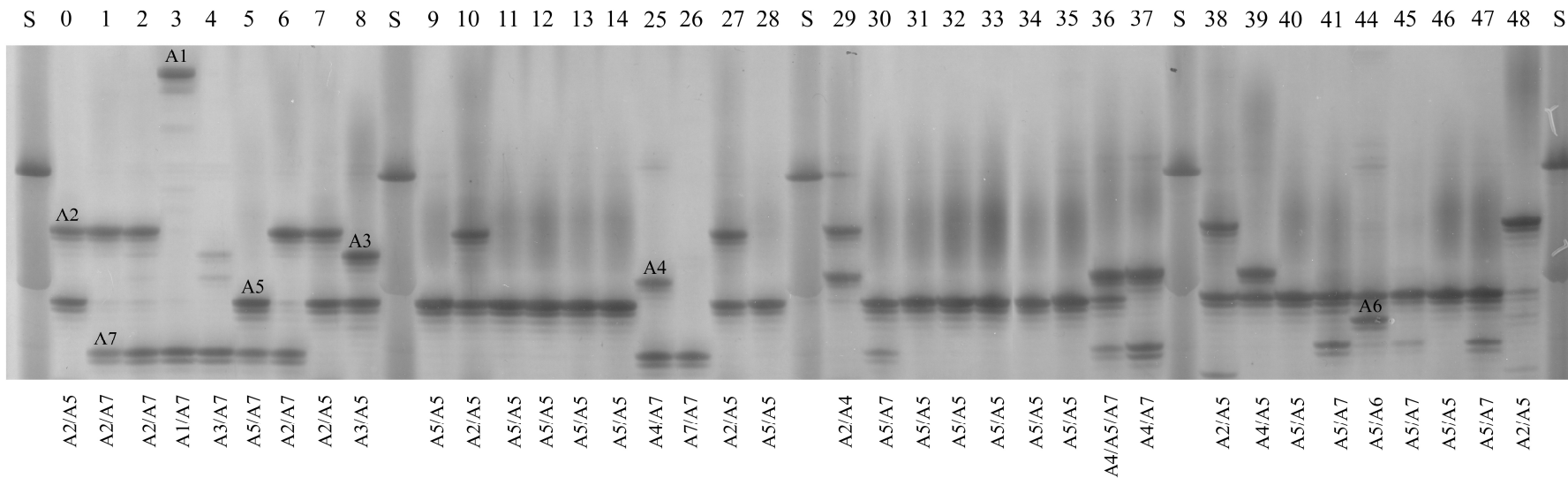
VÝSLEDKY A DISKUZE

Optimalizace amplifikace mikrosatelitních markerů E089, D257 a D347 u rodu *Thymus*

Metodický postup (složení PCR a teplotní a časový profil amplifikace), který pro druh *Thymus praecox* agg. navrhl LANDERGOTT *et al.* (2006) nebylo možné spolehlivě aplikovat. Při použití identických podmínek docházelo k výskytu nescifických amplifikací, netemplátového zabudování bází do amplikonů a tak zvaných „stutter bands“ (SMITH *et al.*, 1995). Z těchto důvodů byla provedena optimalizace složení amplifikačních reakcí i vlastních teplotních podmínek PCR pomocí řady křížových experimentů. Modifikace složení reakční směsi spočívala zejména v přidání tetramethyl amonium oxalátu (0,2 mM). Tato komponenta PCR vykazuje obdobný efekt jako formamid nebo DMSO. Napomáhá například k odstraňování vlásenkových struktur templátové DNA, které bývají způsobeny nejčastěji výskytem GC domén (KOVÁROVÁ a DRÁBER, 2000).

LANDERGOTT *et al.* (2006) uvádí že pro detekci polymorfismů byla použita přímá sekvenace PCR amplikonů. Elektroforetická detekce polymorfních alel 3 mikrosatelitních lokusů u rodu *Thymus* byla spolehlivá a jednoznačná – Obr 2. Rovněž rozpětí velikostí aplikonů 124 – 142 bp u lokusu E089, 73 – 142 u lokusu D257 a 104 - 163 bp u lokusu D347 odpovídá výsledkům, které publikoval LANDERGOTT *et al.* (2006).

Obr 2.: Elektroforeogram alelických sestav mikrosatelitního lokusu E089 – označení a taxonomické zařazení hodnocených genotypů je uvedeno v Tab 1.



S - hmotnostní standard (GeneRuler TM 50 bp DNA Ladder, Fermentas)

Frekvence jedinců s diploidními a polyploidními sestavami alel hodnocených lokusů

Z Tab 1. vyplývá, že pro analýzy bylo použito celkem 37 rostlin, které byly taxonomicky zařazeny do 6 botanických skupin dle druhů, respektive poddruhů. U 34 rostlin byla zjištěna přítomnost vždy pouze dvou alel u všech mikrosatelitních lokusů. U 3 jedinců byl zjištěn výskyt alespoň jednoho lokusu s vyšším počtem alel než 2. Jedná se o následující genotypy:

Thymus valesciacus (A2A7 B6B8B12B14 C8C15)

Thymus pulegioides L. (A4A5A7 B8B13 C3C9C13C14) – Obr. 2 (č.36)

Thymus pulegioides L. (A5A7 B1B6B14 C4C9C10C12).

Je patrné, že ke zvýšení počtu alel došlo pouze u 8,1 % hodnocených rostlin a to pouze u dvou populací. Výskyt 3 respektive 4 variabilních alel alespoň pro jeden genotyp je charakteristický pro všechny tři hodnocené mikrosatelitní lokusy. U druhu *Thymus valesciacus* se nepodařilo zjistit bližší informace o jeho karyotypu. Z provedených molekulárních analýz vyplývá, že u jednoho jedince (vzorek č. 3) zřejmě došlo k alloplodii – lokus D257 je zde prezentován 4 B alelami. *Thymus pulegioides* L. je diploidní druh ($2n = 28$). U dvou jedinců (vzorky č. 36 a 47) byly zjištěny polyploidní počty a to rovnou ve dvou mikrosatelitních lokusech E089 a D347 respektive D257 a D347. Z porovnání alelických sestav v lokusu D347 (vždy 4 různé C alely) u dvou zástupců *Thymus pulegioides* L. vyplývá možná hypotéza, že tito jedinci vznikli na základě alloplodie a jedná se tudíž o tetraploidní genotypy. V lokusu E089 respektive D257 se u těchto genotypů vyskytují vždy tři odlišné alely. Přítomnost 3 odlišných alel by teoreticky nasvědčovala možnému triploidnímu genotypu. Tuto hypotézu je však možné spolehlivě vyloučit již zmiňovanou analýzou lokusu D347, který je vždy charakteristický 4 různými C alelami. Přítomnost pouze 3 alel u lokusů D257 respektive E089 si lze vysvětlit tím, že jeden z lokusů je přítomen v homozygotní sestavě a jedná se tudíž rovněž o tetraploidní genotyp.

Provedené genetické analýzy jednoznačně nepotvrdily předpoklad, že *Thymus praecox* Opiz. s karyotypem somatické buňky obsahujícím 54 chromozómů je alloplodním druhem. Původní hypotéza u tohoto druhu byla taková, že v lokusech by se teoreticky měly vyskytovat 4 různé alely. Pro analýzu byly použity pouze dvě rostliny. Ani u jedné z nich se nepodařilo detekovat více než 2 alely v lokusu. Tetraploidní charakter materiálu však nelze vyloučit z důvodů teoreticky možných homozygotních sestav polyploidních lokusů. Molekulární analýzy jsou podpořeny řadou prací, ve kterých byla mezidruhová hybridizace zkoumána na základě morfologických znaků. V oblastech, kde se stýkají dva nebo více druhů mateřídoušek, dochází velmi často ke křížení. Rozpoznávání hybridů ztěžuje jejich fertilita a zpětné křížení (ČÁP, 1979). Z těchto důvodů lze získané výsledky považovat za originální metodu, která může doplnit řadu taxonomických studií u rodu *Thymus*.

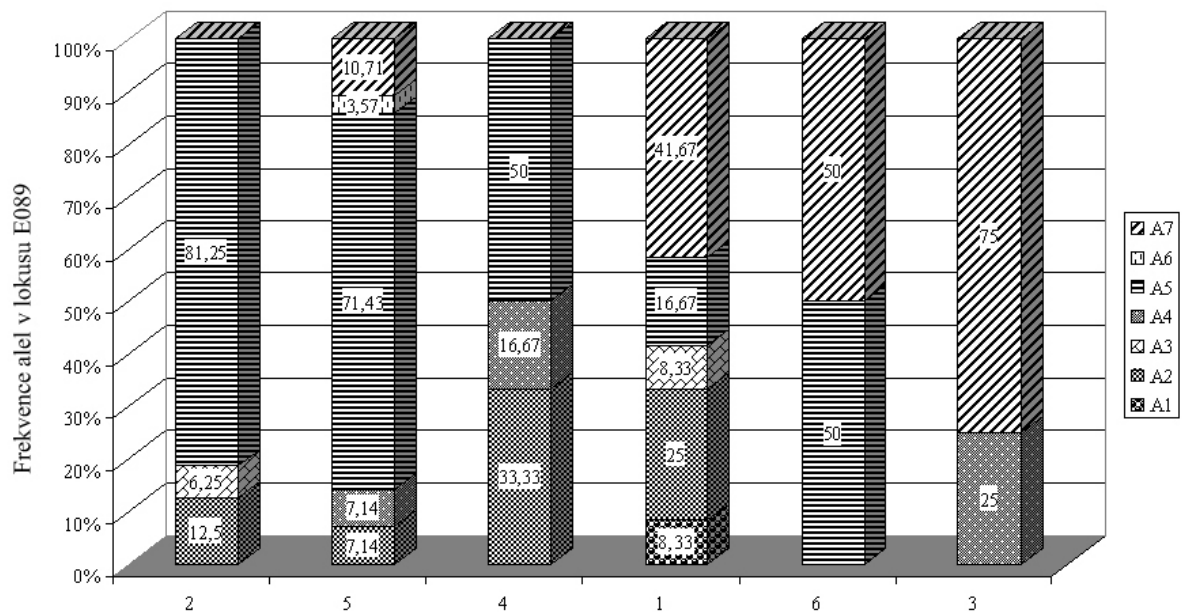
Vzhledem k tomu, že pro studium variability populací rodu *Thymus* byl použit program TFPGA, který nedokáže vzájemně porovnávat diploidní a polyploidní genotypy těže

populace, byly pro následující analýzy použity pouze rostliny s detekovanými dvěma polymorfními alely v jednom lokusu.

Frekvence polymorfních mikrosatelitních alel u jednotlivých populacích

Na následujících grafech je uveden přehled polymorfních alel, které byly detekovány u mikrosatelitních lokusů E089, D257 a D347.

Graf 1. Frekvence alel v mikrosatelitním lokusu E089



2 - *Thymus pulegioides* L. subsp. *chamaedrys* (Fries) Gusul. ($2n = 28$)

5 - *Thymus pulegioides* L. ($2n = 28$)

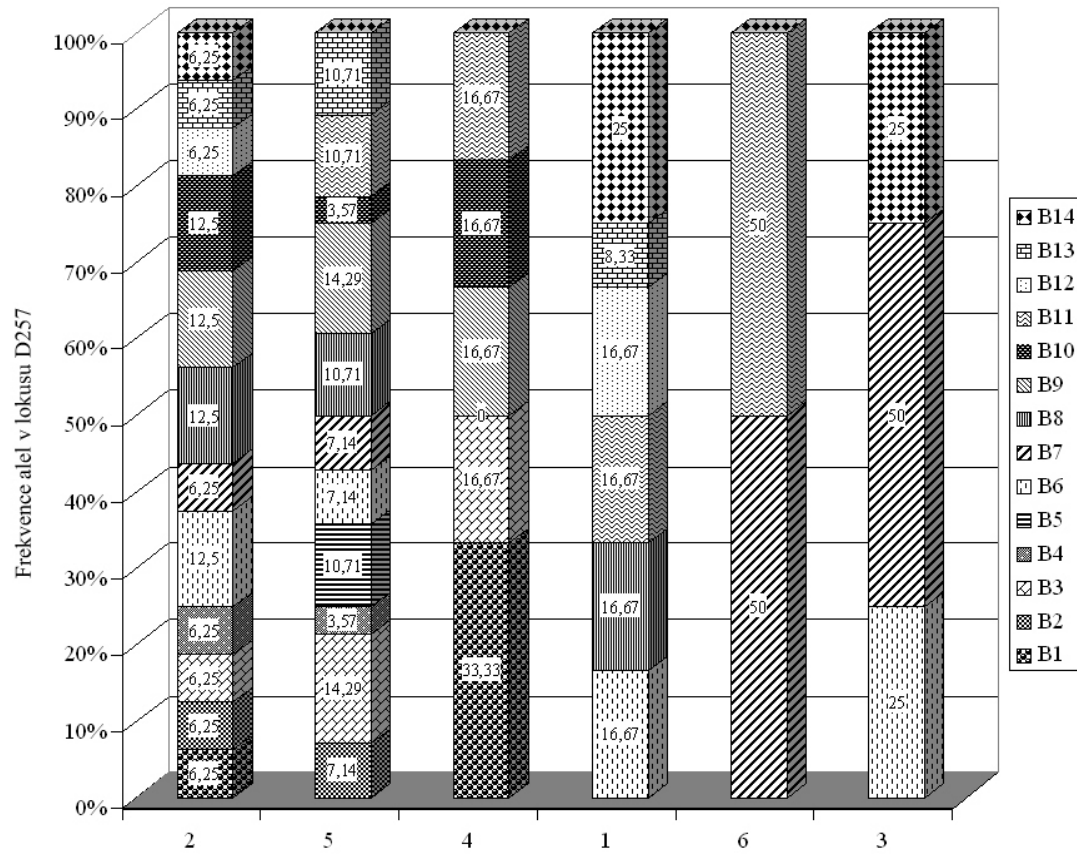
4 - *Thymus serpyllum* emend. Miller ($2n = 24$)

1 - *Thymus valesiacus* ($2n = ?$)

6 - *Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* (Lyka) P. A. Schmidt ($2n = 30$)

3 - *Thymus praecox* Opiz ($2n = 54$)

Graf 2. Frekvence alel v mikrosatelitním lokusu D257



2 - *Thymus pulegioides* L. subsp. *chamaedrys* (Fries) Gusul. (2n = 28)

5 - *Thymus pulegioides* L. (2n = 28)

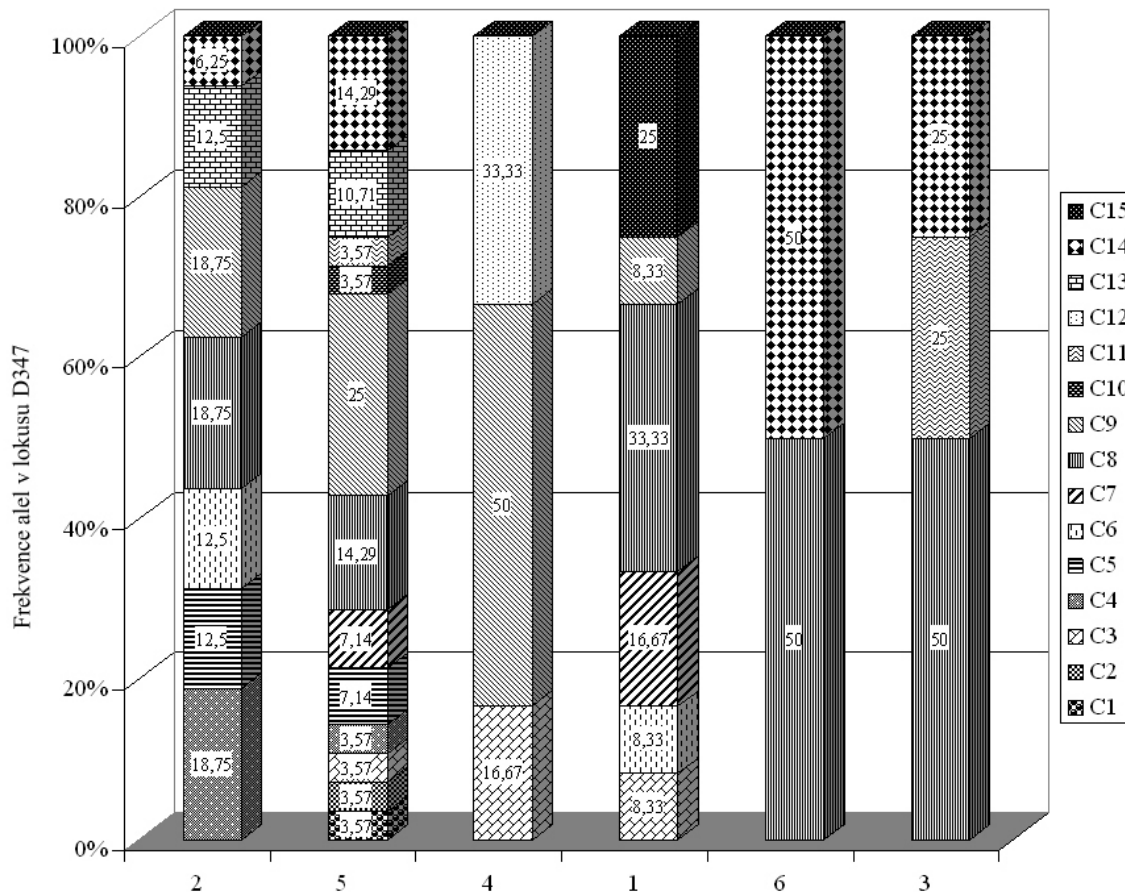
4 - *Thymus serpyllum* emend. Miller (2n = 24)

1 - *Thymus valesciacus* (2n = ?)

6 - *Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* (Lyka) P. A. Schmidt (2n = 30)

3 - *Thymus praecox* Opiz (2n = 54)

Graf 3. Frekvence alel v mikrosatelitním lokusu D347



2 - *Thymus pulegioides* L. subsp. *chamaedrys* (Fries) Gusul. (2n = 28)

5 - *Thymus pulegioides* L. (2n = 28)

4 - *Thymus serpyllum* emend. Miller (2n = 24)

1 - *Thymus valesciacus* (2n = ?)

6 - *Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* (Lyka) P. A. Schmidt (2n = 30)

3 - *Thymus praecox* Opiz (2n = 54)

Získané výsledky lze diskutovat s počtem alel u jednotlivých lokusů, které navrhli LANDERGOTT *et al.* (2006) při hodnocení 40 genotypů deseti švýcarských populací druhu *Thymus praecox* agg. Počet polymorfních alel nalezených pro tento druh v lokusu E089 byl jen o jednu nižší než u hodnocených šesti populací odlišných druhů a lze tedy konstatovat, že trinukleotidový mikrosatelit E089, se sedmi odlišnými alelami, prokazoval jednoznačně nejnižší variabilitu. Dinukleotidový lokus D257 byl LANDERGOTTEM *et al.* (2006) posuzován ještě s dalšími třemi mikrosatelity, které dohromady poskytovaly 17-24 odlišných alel. Při hodnocení dvou jedinců druhu *T. praecox* Opiz. z ČR byly nalezeny pouze 3 alely a

ze získaných dat je tedy zřejmé, že analýzy jsou ovlivněny počtem hodnocených genotypů. Konečného počtu 14 polymorfních alel pro tento lokus bylo dosaženo zejména díky druhům *T. valesciacus* a *T. pulegioides* L. Nejvyšší stupeň variability prokázal mikrosatelit D347, u kterého zaznamenali LANDERGOTT *et al.* (2006) 39 alel. Počet objevených alel u více druhů byl zhruba poloviční, což vysvětluje fakt, že hodnocené populace byly převážně diploidní, oproti tetraploidním rostlinám *T. praecox* agg.

Frekvence jedinců s homozygotní sestavou alel hodnocených mikrosatelitů

Homozygotní sestava alel v lokusu E089 byla zjištěna u 38,24 % všech hodnocených rostlin. Všechny homozygotní sestavy odpovídaly alelické kombinaci A5A5. Homozygotní sestavy byly zjištěny u následujících druhů: *Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul., *Thymus pulegioides* L. a *Thymus serpyllum* L. emend. Miller.

Homozygotní sestava alel v lokusu D257 byla detekována u 5,88 % všech hodnocených rostlin. Polovina homozygotů vykazovala alelickou kombinaci B5B5 (*Thymus pulegioides* L.) a druhá polovina kombinaci ale B8B8 (*Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul.).

Homozygotní sestava alel v lokusu D347 byla nalezena rovněž u 5,88 % všech hodnocených rostlin. Polovina homozygotů byla charakteristická alelickou sestavou C9C9 a druhá polovina sestavou C12C12. Homozygotní sestavy v tomto lokusu byly zjištěny pouze u botanického druhu *Thymus serpyllum* L. emend. Miller.

Přítomnost dvou homozygotních lokusů byla zjištěna vždy u jednoho zástupce *Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul. (genotyp A5A5B8B8C8C13) a *Thymus pulegioides* L. (genotyp A5A5B8B8C11C14). Výskyt homozygotních jedinců ve dvou lokusech pouze u těchto dvou populací lze vysvětlit tím, že obě populace byly zastoupeny největším počtem hodnocených rostlin. Z hlediska původu lze tyto populace považovat za prostorově dostatečně izolované. Rostliny *Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul. pochází z výsevu semen, který byl realizován na LF MU v Brně Kraví Hoře. Druhá populace *Thymus pulegioides* L. byla získána sběrem v několika přirozených lokalitách v oblasti Krušných hor, Doupovských vrchů a Moravskoslezských Beskyd (Obr 1). Z tohoto pohledu lze vyvodit hypotézu, že homozygotní sestava A5A5 mikrosatelitního lokusu E089 by mohla být geneticky konzervovaná u různých poddruhů *Thymus pulegioides* L.

Druhy, u kterých nebyla zjištěna homozygotní sestava alel u žádného ze tří použitých mikrosatelitních markerů jsou následující: *Thymus valesciacus* a *Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* Lyka P. A. Schmidt. Tato skutečnost je zajímavá zejména z pohledu druhu *Thymus valesciacus*, u kterého bylo hodnoceno celkem 6 rostlin. Při studiu taxonomické literatury zaměřené na rod *Thymus* nebyly u tohoto druhu získány žádné botanické ani cytogenetické informace, kromě jediného internetového odkazu (<http://www.marktplaza.nl/Thymus-valesciacus-1757703.php>). Jedná se o nabídkový katalog holandské zahradnické firmy Mark Plaza, která se zabývá distribucí okrasných rostlin včetně skalniček a léčivých rostlin. Hodnocených 6 rostlin tohoto druhu pocházelo ze sbírek MZLU ZF v Lednici na Moravě. Z Grafu 1, Grafu 2 a Grafu 3 vyplývá, že v lokusu E089 bylo detekováno 5 polymorfních alel, v lokusu D257 6 polymorfních alel a v lokusu D347 rovněž 6 polymorfních alel. Všech 6

jedinců *Thymus valesciacus* bylo možno pomocí těchto markerů vzájemně odlišit. Současně nebyla detekována ani jedna homozygotní sestava, která je charakteristická pro inbrední populace. Z těchto výsledků vyplývá fakt, že rostliny pocházející ze sbírek MZLU ZF v Lednici na Moravě, nepředstavují soubor klonovaných rostlin, které jsou typické pro komerčně množené **skalničky**. Jedná se o geneticky variabilní populaci, u které lze předpokládat pohlavní způsob rozmnožování a šíření.

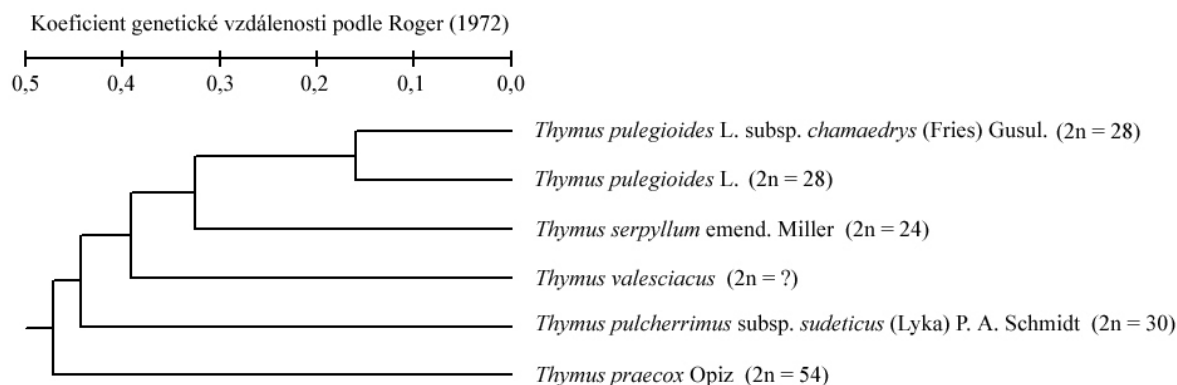
Další druhem, u kterých nebyl zjištěn výskyt žádných homozygotních alelických sestav byl *Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* Lyka P. A. Schmidt. Tato skutečnost vyplývá zejména z nízkého počtu hodnocených rostlin – Tab. 1.

U druhu *Thymus praecox* Opiz. byly detekovány vždy dvě alely u každého lokusu, které by teoreticky mohly odpovídat heterozygotní sestavě alel. Z cytogenetických studií u tohoto druhu vyplývá, že se jedná o alloplidní gynodioický druh ($2n = 54$) a proto se lze přiklonit k hypotéze, že se jedná o homozygotní sestavy alel a každá alela je současně v karyotypu reprezentována čtyřmi kopiemi.

Genetické podobnosti mezi hodnocenými druhy rodu *Thymus*

Pro zpracování genetických podobností alelických kombinací v mikrosatelitních lokusech E089, D257 a D347 byl použit program TFPGA. Tento program využívá v molekulární taxonomii a evoluční biologii řada autorů – například Li et al. (2008). Vzájemná podobnost detekovaných genotypů byla stanovena na základě podobnostního koeficientu podle ROGER (1972). Výhodou tohoto algoritmu je, že získaná data jsou hodnocena z pohledu kodominantních mikrosatelitních markerů charakterizujících vždy danou konkrétní populaci – botanický druh. Postup založený na vyhodnocení binární datové matice RAPD polymorfismů, který u léčivých rostlin použili např. PIORO-JABRUCKA et al. (2007) a VAŠÍČKOVÁ et al. (2008), umožnil pouhý odhad genetické podobnosti na základě Diceho podobnostních koeficientů.

Obr. 3. Dendrogram vyjadřující genetické vzdálenosti alelických sestav mikrosatelitních lokusů E089, D257 a D347 u hodnocených zástupců rodu *Thymus*



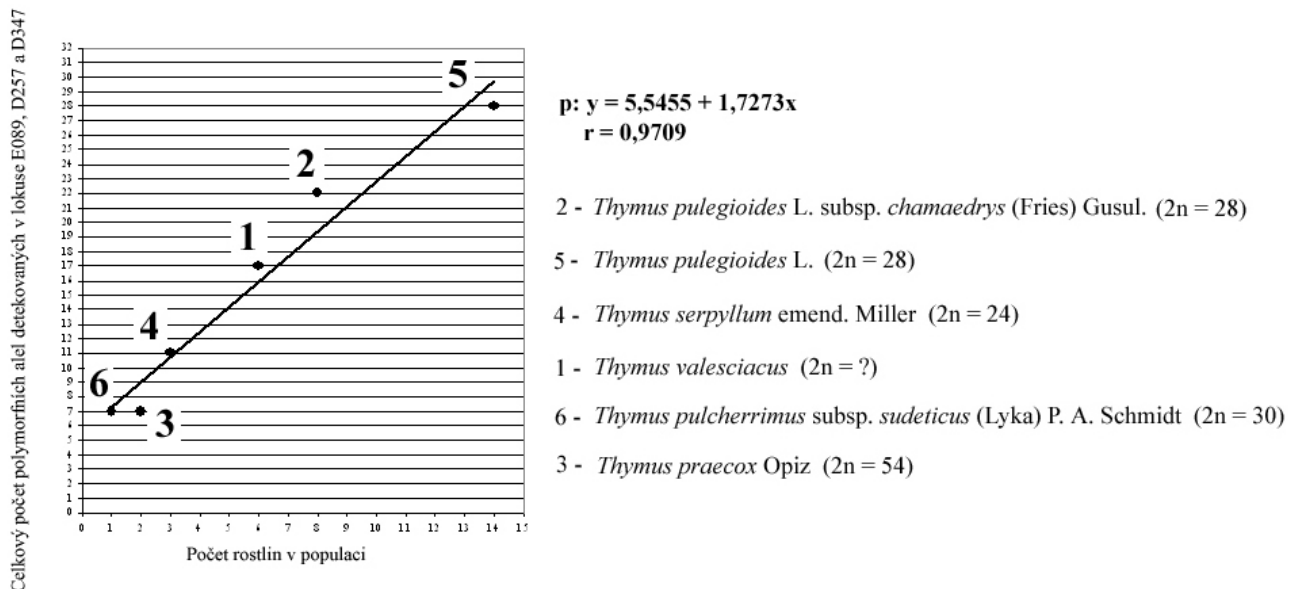
Z dendrogramu vyplývá, že nejmenší genetickou vzdálenost vykazovaly *Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul. a *Thymus pulegioides* L. – u kterých byla

hodnota koeficientu podle ROGER (1972) pouze 0,1596. Tento výsledek koreluje rovněž s taxonomickými a cytogenetickými charakteristikami (SLAVÍK *et al.*, 2000). Jedná se o poddruh se shodným karyotypem ($2n = 28$). Další diploidní druh *Thymus serpyllum* L. emend. Miller ($2n = 24$) vykazoval oproti předchozí dvojici druhů genetickou vzdálenost odpovídající koeficientu 0,3914. Největší genetickou vzdálenost od druhů s relativně nízkým počtem chromozómů (*Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul. a *Thymus pulegioides* L.) vykazoval *Thymus praecox* Opiz. s $2n = 54$ (SLAVÍK *et al.*, 2000).

Statistické hodnocení závislosti mezi počtem detekovaných polymorfních mikrosatelitních alel a počtem jedinců v populaci

Vztah mezi velikostí populace, biodiverzitou a adaptační schopností byl zkoumán řadou autorů, např. KAENE *et al.* (1999). Výrazné zredukování velikosti populace obvykle okamžitě vyvolává snížení biodiverzity a následné snížení fitness. Tato skutečnost se týká rovněž kolekcí genových zdrojů původních planých druhů, které byly introdukovány z původních lokalit do sbírkových kolekcí genových bank (CHLOUPEK, 2000). Variabilní počet rostlin u jednotlivých hodnocených druhů rodu *Thymus* byl využit jako modelový statistický příklad takovéto situace. Pomocí regresní a korelační analýzy uvedené na *Graf 4*, bylo jednoznačně potvrzeno, že se vzrůstajícím počtem jedinců v populaci vzrůstá i počet alel mikrosatelitních lokusů E089, D257 a D347. Zjištěná hodnota korelačního koeficientu $r = 0,9709$ odpovídá velmi těsné závislosti.

Graf 4. Statistické hodnocení závislosti počtu detekovaných mikrosatelitních alel na počtu analyzovaných jedinců



ZÁVĚR

Byla optimalizována amplifikace mikrosatelitních markerů E089, D257 a D347 pro různé druhy rodu *Thymus*. Pro každý lokus byl u 37 genotypů s diploidními a polyploidními sestavami stanoven počet polymorfních alel. U 3 jedinců byl zjištěn výskyt alespoň jednoho lokusu s vyšším počtem alel než 2. Byla zjištěna frekvence polymorfních mikrosatelitních alel u jednotlivých populacích. Homozygotní sestava alel v lokusu E089 byla zjištěna u 38,24 % všech hodnocených rostlin. V lokusech D257 a D347 byla detekována u 5,88 % genotypů. Pro zpracování genetických podobností alelických kombinací v mikrosatelitních lokusech E089, D257 a D347 byl použit program TFPGA. Největší genetickou vzdálenost od druhů s relativně nízkým počtem chromozómů (*Thymus pulegioides* L. subs. *chamaedrys* (Fries) Gusul. a *Thymus pulegioides* L.) vykazoval *Thymus praecox* Opiz. s $2n = 54$ (Slavík *et al.*, 2000). Pomocí regresní a korelační analýzy bylo jednoznačně potvrzeno, že se vzrůstajícím počtem jedinců v populaci vzrůstá i počet alel mikrosatelitních lokusů E089, D257 a D347.

LITERATURA

- Barák J., Brouzdal P. (2004): Proč se to nepovedlo tak, jak jsme doufali. *Plant, Soil and Environment*, 40(8): 253-256.
- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., Mergeai, G. (2006): Optimalization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10(2): 77 – 81.
- Berglund, A.B.N., Saura A., Westerbergh A. (2006): Electrophoretic evidence for disomic inheritance and allopolyploid origin of the octoploid *Cerastium alpinum* (*Caryophyllaceae*), *Journal of Heredity*, 97(3):296-302.
- Briggs, D., Walters, S.M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, 531 s., ISBN 80-244-0186-X.
- Castleman, M. (2004): Velká kniha léčivých rostlin, Columbus, 524-528p. ISBN 80-7249-177-6.
- Čáp, J.(1979): Klíč k určování československých mateřídoušek, *Zpr. Čs. Bot. Společ.* 14, s 101-108, Praha.
- Dostál, J. (1989): Nová květena ČSSR 2, Academia Praha, ISBN-200-0095-X.
- Chloupek, O. (2000): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia, Praha. 310 s., ISBN 80-200-0779-2.
- Jakše, J., Javornik, B. (2001): High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus*. L.), *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 217-226, ISSN 0735-9640.
- Keane, B., Pelikan, S., Toth, G.P., Rogstad, S.H. (1999): Genetic diversity of *Typha latifolia* (*Typhaceae*) and the impact of pollutants examined with tandem repetitive DNA probes, *American Journal of Botany*, 86:1226-1238.
- Kovárová M., Dráber P. (2000): New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions, *Nucleic Acids Res.*, 28(13): e70.
- Landergott, U., Naciri, Y., Schneller, J. J., Holderegger, R.(2006): Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg., *Theoretical and Applied Genetics*, 113:453-465, ISSN 1432-2242.
- Lawrence, B. A., Tucke,r A. O., (2002): in Stahl-Biskup, E. – Sáez, F. (2002): Thyme, The genus *Thymus*, Taylor a Francis, 252-261p, ISBN 0-415-28488-0.
- Li, XX., Ding, XY., Chu, BH., (2008): Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (*Orchidaceae*) based on AFLP. *Genetica*, 133(2): 159-166.

- Li, Y. Ch., 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, ISSN 1365-294X.
- Pannell, J. R., Obbard D. J., Buggs R. J. A. (2004): Polyploidy and the sexual system: what can we learn from *Mercurialis annua*? *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4): 295.
- Piuro-Jabrucka, E., Suchorska-Tropio, K., Szalacha, E. (2007): Genetic and chemical variability of common thyme (*Thymus pulegioides* L.) and wild thyme (*Tymus serpyllum* L.), *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 517:593-601.
- Roger, J. (1972): Measures of genetic similarity and distance, *Studies Genetics VII*, University Texas Publ. (7213), Texas, pp 145-153.
- Slavík, B.(ed.) (2000): Květena České republiky 6.díl, Academia Praha, ISBN 80-200-0306-1.
- Smith J. R., Carpten J. D., Brownstein M. J., Ghosh S., Magnuson V. L., Gilbert D. A., Trent J. M. ,Collins F. S. (1995): Approach to Genotyping Errors Caused by Nontemplated Nucleotide Addition by *Taq* DNA Polymerase, *Genome Res.*, 5: 312-317.
- Stahl-Biskup, E. – Sáez, F. (2002): Thyme ,The genus *Thymus*, Taylor a Francis, 354 s., ISBN 0-415-28488-0.
- Vašíčková, Š., Vejl, P., Zoufalá, J., Česká, J. (2008): Molekulární charakteristika vnitrodruhové variability vybraných botanických taxonů. Hodnotenie genetických zdrojov rasiín pre výživu a poľnohospodárstvo, Piešťany, 6.-7. května 2008, pp 26, ISBN 978-80-88872-74-0.