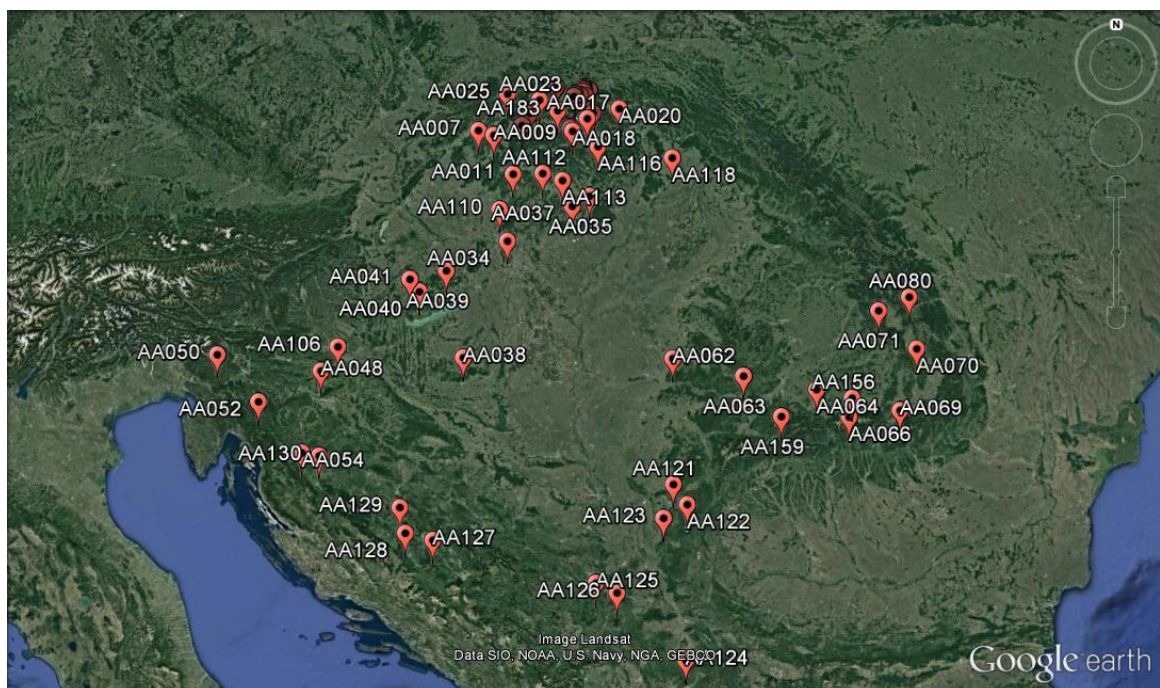
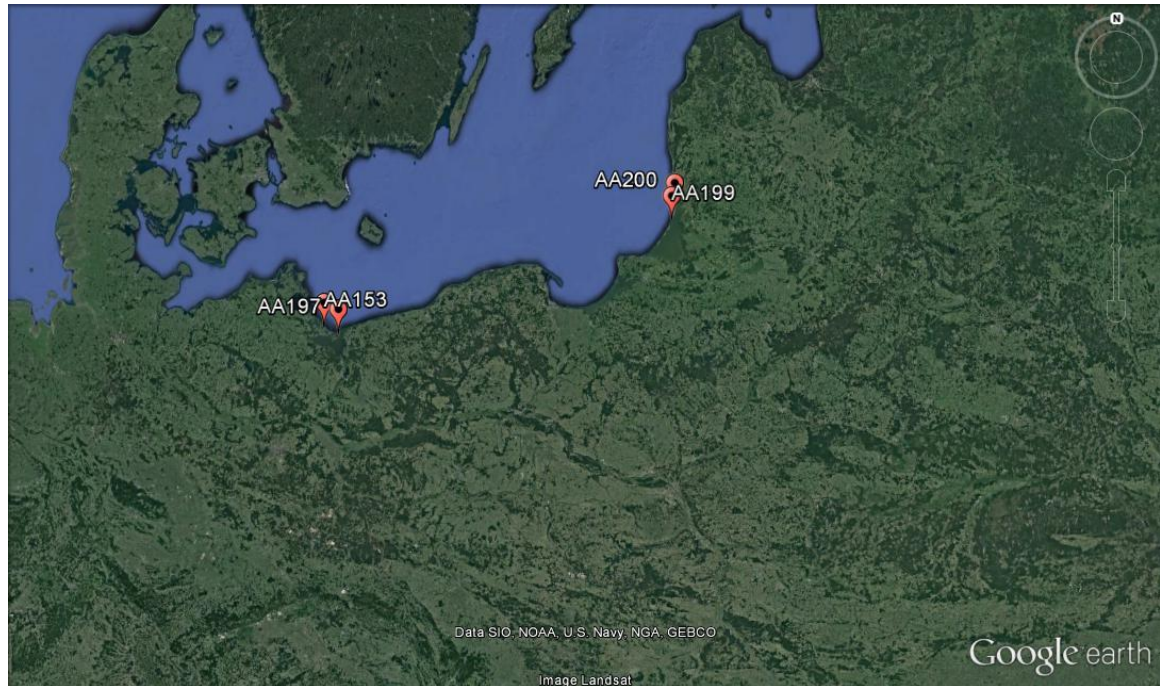


Přílohy

A. Mapy lokalit sbíraných populací – bližší pohledy na pobřeží Baltského moře (horní obrázek) a na střední a jižní část areálu rozšíření diploidní linie *Arabidopsis arenosa*



B. Tabulky souhrnných informací o multiplexech primerů

barva	NED	VIC	6-FAM	PET	VIC	6-FAM	NED
lokus	F20D22	F21M12	F19G10	F19K23-483	ICE12	ICE11	MDC16
opakovaná jednotka	GTTT	GAAA	GT	TTC	CT	GA	GA
forward primer	CCCAAGTGAGTC TGGTTC	GGCTTCTCGAAAT CTGTCC	AGTTGGTCCTCGA GCTCTCC	GGCTAAATTGCCG TTGTTGC	CTCATGGCAAAAAG AGGGAAA	TTTCAAGTTGAGA AGTGGAGTG	GAGTGGCCTCGTG TAGAGAAAAG
reverse primer	AACAAAATGAGTT TCTCTGCATG	TTACTTTTGCCTC TTGTCATTG	AAGAACTTAATTTT TCTCACCCG	GAATTCTGTAAACAT CCCAATTTCC	GCTCTCTCACCTCG AAGGTC	AAGAATTAGGCAA GAGTTTAGTGG	TGTCACCTCTTTTCC TCTGGTTTG
velikost alel	159-213	138-188	169-185	169-238	215-357	114-154	105-129
multiplex	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2

barva	NED	NED	6-FAM	6-FAM	VIC	6-FAM	PET
lokus	ICE13	AthZFPG (GC15)	ATTS0392 (GC16)	SLL2	ICE14	nga162	ICE7
opakovaná jednotka	ATC	CT	AAG	CA	GAT	GA	GAA
forward primer	GATCCTTCACCGG GTCTTG	TTGCGTTCCACAT TTGTTT	TTTGGAGTTAGAC ACGGATCTG	CATGTACTGGGAT TCAGTGTC	TCGAGGTGCTTTCT GAGGTT	CATGCAATTTGCGAT CTGAGG	TTCAAGGGCAGGA TCAAAAC
reverse primer	GTGGTGGAGACTC TTCGAGC	TGGGTCAATTAC ATGTAGAGA	GTTGATGCGAGCT TGATAAGC	CGTCCCTTTGTGTGG TTACACG	TACCTCACCCCTTTT GACCCA	CTCTGTCACTCTTT TCCTCTGG	GTCTCACTGCTATC GTCACAGG
velikost alel	210-282	116-168	129-174	258-308	200-245	71-93	90-153
multiplex	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1

C. Laboratorní protokoly

C.1. Izolace DNA

- ze sušené biomasy (skladované v silikagelu) odebereme cca 0,5 g a vložíme do plastových zkumavek (Eppendorf, 2 ml) spolu se dvěma wolfram-karbidovými kuličkami
- zkumavky rovnoměrně umístíme do mlýnku Retsch MM200 a drtíme při frekvenci 30 ot./sek. po dobu 3 minut (v případě nutnosti ještě další 2 minuty)
- po rozdrcení materiálu pracujeme v digestoři a přidáme ke každému vzorku 900 μ l roztoku CTAB (smíšeného v poměru 100:2 s merkaptoethanolem), 5 μ l RNasy A a špetku PVP (polyvinylpyrolidon)
- uzavřené zkumavky promícháme na vortexu (Scientific Industries Inc., Vortex-Genie 2) a inkubujeme na termomixeru (Eppendorf, Thermomixer comfort) 30 min při teplotě 60 °C a 1400 rpm
- zkumavky dáme na 6 min do centrifugy (Sigma, 4-16K Centrifuge) a nastavíme maximální otáčky (13200 rpm), poté přepipetujeme supernatant do čistých zkumavek a zbylé usazeniny zlikvidujeme
- ke vzorkům přidáme 500 μ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24:1), uzavřené zkumavky 3x převrátíme a necháme 5 minut odstát
- zkumavky umístíme do centrifugy na 6 min při 13200 rpm a pak přepipetujeme supernatant do čistých zkumavek
- pak zopakujeme poslední dva kroky (přečištění chloroformem a isoamylalkoholem)
- poté přidáme 500 μ l vychlazeného isopropanolu, uzavřené zkumavky 2x převrátíme a necháme minimálně 30 min v mrazáku při -20 °C
- zkumavky umístíme do centrifugy na 3 min při 13200 rpm, supernatant opatrně vylijeme a zkumavky (s DNA ve formě pelletu usazeného na dně) necháme chvíli schnout dnem vzhůru
- ke vzorkům přidáme 400 μ l vychlazeného 96% ethanolu a inkubujeme je 15 min na termomixeru při 37 °C a 1200 rpm
- uzavřené zkumavky umístíme do centrifugy na 6 min při 13200 rpm a pak opět opatrně vylijeme supernatant

- ke vzorkům přidáme 200 μl vychlazeného 70% ethanolu a necháme cca 5 min odstát
- uzavřené zkumavky umístíme do centrifugy na 5 min při 13200 rpm a pak naposled opatrně vylijeme supernatant
- otevřené zkumavky necháme 10-15 min vysychat a pak je umístíme na termomixer, kde je sušíme při teplotě 65 °C dalších minimálně 15 minut (vysušený pellet DNA lze opatrným poklepáním oddělit od stěny zkumavky)
- vysušenou DNA rozpustíme ve 200 μl TE pufru při inkubaci na termomixeru (10 min, 60 °C a 600 rpm)
- DNA lze skladovat v lednici nebo dlouhodobě v mrazáku (až -80 °C)

C.2. Rozpisy pro PCR

C.2.1. Reakční mix pro MyTaq polymerázu

ddH ₂ O	13,4 μl
MyTaq pufr	4,0 μl
Forward („F“) primer	0,13 μl
F primer – fluorescenčně značený FAM	0,5 μl
Reverse („R“) primer	0,5 μl
MyTaq DNAPolymeráza	0,2 μl

- k 18,73 μl mixu byl přidán 1 μl vzorku DNA

C.2.2. Reakční mix pro REDTaq polymerázu

ddH ₂ O	6,2 μl
hořečnaté ionty (Mg ²⁺)	0,5 μl
Red Taq pufr	1,0 μl
dNTP	0,2 μl
směs primerů (F+R)	0,6 μl
REDTaq DNAPolymeráza	0,5 μl

- k 9 μl mixu byl přidán 1 μl vzorku DNA

C.2.3. Reakční mix pro QIAGEN Multiplex PCR Kit

ddH ₂ O	1,0 µl
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	2,5 µl
10x primer-mix	0,5 µl

- ke 4 µl mixu byl přidán 1 µl vzorku DNA

C.2.4. Koncentrace primerů v primer-mixu M2

- F20D22 0,75 pmol/µl
- F21M12 0,75 pmol/µl
- F19G10 0,75 pmol/µl
- F19K23-483 1 pmol/µl
- ICE11 2 pmol/µl
- MDC16 0,75 pmol/µl

C.3. Programy v termocykleru

C.3.1. Program pro MyTaq polymerázu

- 95 °C 1 min
 - 95 °C 30 s
 - 55 °C 30 s
 - 72 °C 45 s
 - 95 °C 30 s
 - 53 °C 30 s
 - 72 °C 45 s
 - 72 °C 10 min
 - 10 °C teplota udržovaná až do otevření víka termocykleru
- 27x
- 8x

C.3.2. Program pro REDTaq polymerázu

- 94 °C 1 min
 - 94 °C 30 s
 - 50 °C 30 s
 - 72 °C 40 s
 - 72 °C 20 min
 - 10 °C teplota udržovaná až do otevření víka termocykleru
- } 35x

C.3.3. Program pro QIAGEN Multiplex PCR Kit

- 95 °C 15 min
 - 94 °C 30 s
 - 60 °C 90 s
 - 72 °C 1 min
 - 60 °C 30 min
 - 10 °C teplota udržovaná až do otevření víka termocykleru
- } 35x

C.4. Přečištění octanem

- ke vzorkům (1 μ l PCR produktů) přidáme 1 μ l octanu sodného a 10 μ l 96% ethanolu
- krátce promícháme na vortexu a stočíme v centrifuze, pak necháme vzorky 20 min v klidu stát v mrazáku
- vzorky vložíme do předem vychlazené centrifugy (Sigma, 4-16K Centrifuge) a necháme točit při teplotě 4 °C po dobu 30 min a při maximálních otáčkách (3700 rpm)
- poté zkumavky opatrně obrátíme dnem vzhůru na vrstvu buničiny, vložíme zpět do chlazené centrifugy a pustíme na cca 0,5 min při 580 rpm – necháme vytéct supernatant
- ke vzorkům přidáme 100 μ l 70% ethanolu a centrifugujeme 5 min při otáčkách 3700 rpm

- zopakujeme předchozí krok (tj. necháme v centrifuze vytéct supernatant na buničinu) a pak vzorky sušíme v otevřených zkumavkách na termomixeru 6 min při teplotě 60 °C
- takto přečištěné vzorky lze pak skladovat v mrazáku nebo rovnou připravit na fragmentační analýzu

C.5. Příprava na fragmentační analýzu

- ke každému vzorku přidáme 10 μ l směsi Formamidu (iontové rozpouštědlo) a vnitřního žebříčku (GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard) dle následujícího rozpisu:
 - Formamid 10 μ l
 - LIZ 600 0,25 μ l
- DNA ve vzorcích zdenaturujeme při teplotě 95 °C za 3 min
- lze skladovat krátkodobě v lednici

C.6. Příprava na sekvenování mikrosatelitů

- přečištěné vzorky (PCR produkty) naředíme 5 μ l dvakrát destilovanou vodou (ddH₂O)
- roztoky Reverse primerů naředíme na koncentraci $c = 3,2$ pmol/ μ l
- směs pro automatický sekvenátor vytvoříme podle následujícího rozpisu:
 - R-primer 1 μ l
 - vzorek 1 μ l
 - ddH₂O 6 μ l

D. Tvorba dimerů v rámci reverse primeru F19G10 pěti různými způsoby

