

MASARYKOVA  
UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

# Vertikální tok genů jako ukazatel reprodukční úspěšnosti

Jan Vlha

Vedoucí práce: doc. Mgr. Natália Martínková, Ph.D.

Matematická biologie – Experimentální biologie

Brno 2021



## Bibliografický záznam

<b>Autor:</b>	Jan Vlha Přírodovědecká fakulta Masarykova Univerzita
<b>Název práce:</b>	Vertikální tok genů jako ukazatel reprodukční úspěšnosti
<b>Studijní program:</b>	<b>PřF B-EXB</b> Experimentální biologie
<b>Studijní obor:</b>	<b>PřF BIMAT</b> Matematická biologie
<b>Vedoucí práce:</b>	doc. Mgr. Natália Martínková, Ph.D.
<b>Rok:</b>	2021
<b>Počet stran:</b>	38
<b>Klíčová slova:</b>	ještěrka obecná ( <i>Lacerta agilis</i> ), mikrosatelity, příbuznost, mutační modely, Hardy-Weinbergova rovnováha, barevné formy

## Bibliographic record

**Autor:** Jan Vlha  
Faculty of Science  
Masaryk University

**Title of thesis:** Vertical gene flow as a proxy for reproductive fitness

**Degree Programme:** **PřF B-EXB** Experimental biology

**Field of Study:** **PřF BIMAT** Mathematical biology

**Supervisor:** doc. Mgr. Natália Martínková, Ph.D.

**Year:** 2021

**Number of Pages:** 38

**Keywords:** sand lizard (*Lacerta agilis*), microsatellites, relatedness, mutation models, Hardy-Weinberg equilibrium, colour forms

ZADÁNÍ  
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2020/2021

---

<b>Ústav:</b>	Přírodovědecká fakulta
<b>Student:</b>	Jan Vlha
<b>Program:</b>	Experimentální biologie
<b>Obor:</b>	Matematická biologie

---

Ředitel ústavu PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

---

<b>Název práce:</b>	Vertikální tok genů jako ukazatel reprodukční úspěšnosti
<b>Název práce anglicky:</b>	Vertical gene flow as a proxy for reproductive fitness
<b>Jazyk závěrečné práce:</b>	čeština

---

**Oficiální zadání:**

Reprodukční úspěšnost představuje příspěvek konkrétního genotypu do genofondu následující generace. Pro jedince to znamená, že jeho reprodukční úspěšnost zvyšuje nejenom přežití jeho vlastních potomků, ale i přežití potomků jeho blízkých příbuzných. Student použije metody izolace DNA a molekulárního genotypování na určení genotypů ještěrek obecných. Nastuduje si výpočet příbuznosti a reprodukční úspěšnosti na základě genetických dat a vybrané metody aplikuje na modelová data s ohledem na věkové kohorty ještěrek. Výsledky vyhodnotí v souvislosti s pozorovaným barevným polymorfismem jedinců.

*Literatura:*

WANG, J. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol. Ecol. Resour.*, 2011, roč. 11, s. 141-145.

SACCHI R, COLADONATO AJ, GHITTI M, MANGIACOTTI M, SCALI S, BOVO M, ZUFFI M. Morph-specific assortative mating in common wall lizard females. *Current Zoology*, 2018, roč. 64, s. 449-453.

---

<b>Vedoucí práce:</b>	doc. Mgr. Natálie Martínková, Ph.D.
<b>Datum zadání práce:</b>	2. 10. 2020
<b>V Brně dne:</b>	1. 6. 2021

---

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Jan Vlha, 27. 1. 2021

doc. Mgr. Natálie Martínková, Ph.D., 4. 2. 2021

RNDr. Tomáš Pavlík, Ph.D., 8. 2. 2021

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně a pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou práci citovány.

V Brně 31. května 2021

.....  
Jan Vlha

## Poděkování

Rád bych poděkoval Michalu Škrobánkovi za posbírání vzorků z Opavy a Vítkova a Kateřině Brestovské za posbírání vzorků z Jihlavy. Velké poděkování patří také Ing. Radovanu Smolinskému, Ph.D., Ph.D., Mgr. Zuzaně Hiadlovské, Ph.D. a doc. Mgr. Natálii Martínkové, Ph.D za ovzorkování populace ještěrek obecných v Hustopečích. Další dík patří také RNDr. Alexandře Zahradníkové jr., Ph.D. za izolaci DNA ze vzorků a opět doc. Mgr. Natálii Martínkové, Ph.D za genotypování vzorků.

V neposlední řadě chci poděkovat své vedoucí doc. Mgr. Natálii Martínkové, Ph.D za její otevřený a trpělivý přístup, a za její ochotu věnovat mi i svůj osobní čas, kterého jsem potřeboval hodně a svému konzultantovi Ing. Radovanu Smolinskému, Ph.D. za jeho vstřícný přístup, konstruktivní kriticismus a ochotu pomoci i s těmi nejtriviálnějšími věcmi.

Děkuji také všem lidem, kteří se zúčastnili mých online konzultací přes MS Teams a poskytovali mi zpětnou vazbu.

## Obsah

	<b>Abstrakt, Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>3</b>
1.1	Genový tok.....	3
1.1.1	Vertikální genový tok.....	3
1.1.2	Hardy-Weinbergův princip.....	4
1.1.3	Mechanismy ovlivňující Hardy-Weinbergovu rovnováhu v populaci.....	4
1.1.3.2	Selekce a selekční tlak.....	5
1.1.3.3	Náhodný genetický posun (genetický drift).....	5
1.2	Mikrosatelity.....	7
1.2.1	Struktura mikrosatelitů.....	7
1.2.2	Mutace mikrosatelitů.....	8
1.2.3	Nulové alely.....	9
1.3	Vznik zbarvení u plazů.....	10
1.3.1	Barevný polymorfismus.....	11
1.4	Mutační modely.....	12
1.4.1	Model nekonečných alel (Infinite Alleles model).....	12
1.4.2	Krokový model (Stepwise Mutation model).....	13
1.5	Cíle práce.....	14
<b>2</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>27</b>



## Abstrakt

Rodiče předávají svým potomkům do nové generace svou genetickou informaci. Mezi předávanou genetickou informací jsou i mikrosatelity, krátké tandemové repetice, podle kterých je možné definovat každého jedince, díky jejich vysoké mutační rychlosti. Tato mutační rychlost znamená, že každý jedinec má svoji vlastní sadu mikrosatelitů, která je pro něj jedinečná. Vzhledem k této své vlastnosti jsou mikrosatelity používány jako genetické markery a lze podle nich zkoumat sociální strukturu populace, partnerské preference anebo právě reprodukční úspěšnost. Za použití pěti lokusů druhu *Lacerta agilis* byla analyzována vzájemná příbuznost jedinců v populacích na třech různých lokalitách. Celkově byly rozpoznány čtyři barevné formy jedinců. Analýzou příbuznosti a hledáním potenciálních vztahů rodič-potomek v populaci byli nalezeni reprodukčně nejúspěšnější jedinci a jejich rozložení bylo porovnáno s celkovým rozložením populace.

## Abstract

Genetic information is one of the many things parents give to their offsprings to help guide them through life. Among the aforementioned genetic information are microsatellites, short tandem repetitions or STRs for short, which can be used to identify a specific individual thanks to their high mutation rate. High mutation rate means that every individual has their own, unique set of STRs. Resulting from this uniqueness is the use of STRs as genetic markers. They can be used to research the social structure of a population, mating behaviour or, alternatively, reproductive fitness. An analysis was conducted using five loci of the sand lizard, *Lacerta agilis*, to determine relatedness coefficients between individuals. Samples from individuals were collected on three separate locations and among the sampled individuals four different colour forms were recognized. Using the individuals' relatedness coefficients, potential parent-offspring relations were determined. On the same note, the most reproductively successful individuals were found, and their distribution based on colour forms was compared to the colour form distribution of the whole sampled population.

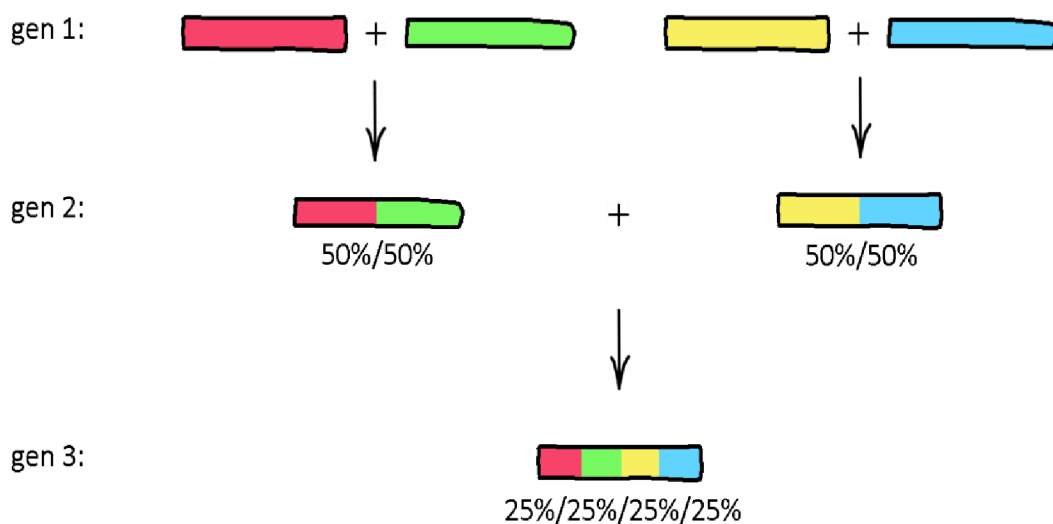
# 1. Úvod

## 1.1 Genový tok

Genový tok může být popsán jako uvedení nového genu do celkového genofondu populace. Druhy genového toku rozlišujeme na vertikální genový tok a horizontální genový tok. Mezi důsledky genového toku patří genetická homogenizace subpopulací, náležících jedné populaci, a tedy zabránění jejich divergenci, případně vzniku nového druhu. Dostatečný genový tok zajišťuje dostatek heterozygotů přítomných v populaci a při analýze populace tedy bude platit přibližná Hardy-Weinbergova rovnováha (Flegr J., 2009).

### 1.1.1 Vertikální genový tok

Vertikálním genovým tokem rozumíme přenos genů tradiční reprodukcí, tedy z rodiče na potomka. Geny se nacházejí v lokusech na chromozomech a při přenosu genetické informace z rodiče na potomka, potomek dostává jednu chromozomovou sadu od každého z rodičů (v případě studovaného organismu ještěrky obecné, *Lacerta agilis*). Geny, přenesené tímto způsobem budou ve sledovaném jedinci pocházet z 50% od otce a z 50% od matky. Ve vztahu rodič-potomek tedy očekáváme 50% příbuznost, stejně tak v případě sourozenců. V případě prarodič-vnuk nebo strýc/teta-synovec/sestřenice očekáváme u těchto jedinců 25% společných genů, a tedy 25% příbuznost (Obr. 1) (M. Kimura, 1955). V našem případě sledujeme genový tok mezi různými generacemi, nikoliv subpopulacemi nebo populacemi.



Obr. 1: Schématické znázornění obsahu procenta společných genů s jedinci z další generace. Barevné segmenty představují celý genom jedince.

Nový gen pak není do generace zanesen jedincem z jiné populace, ale vyskytne se přirozeně mutací mateřského genu. Z dlouhodobého hlediska mohou být mutace opakované a při zmutování dostatečného množství genů může vzniknout zcela nový druh. Za předpokladu, že se rozmnožování řídí zákony dědičnosti a že námi sledovaný gen již dále nemutuje, můžeme předpokládat, že platí Hardy-Weinbergova rovnováha.

### 1.1.2 Hardy-Weinbergův princip

Hardy-Weinbergův princip popisuje rozdělení alel v genofondu Hardy-Weinbergovy populace, což je nejjednodušší možná modelová populace. Pro Hardy-Weinbergovu populaci platí následující podmínky (Cox DG & Kraft P, 2006):

- 1) Populace je zcela panmiktická (mezi jedinci platí náhodné páření).
- 2) Populace je dostatečně velká, tedy alespoň tak, aby na ni neměl zásadní vliv genetický drift.
- 3) V populaci nedochází k migraci ani k selekci.
- 4) Sledovaný gen nepodléhá dalším mutacím.

Pokud v populaci platí tyto podmínky, pak ji nazýváme Hardy-Weinbergovou populací a platí v ní Hardy-Weinbergův princip:

- 1) Frekvence genotypů závisí na frekvencích alel v populaci.
- 2) Frekvence alel z generace na generaci zůstává stálá, tento jev se nazývá Hardy-Weinbergova rovnováha, která je vyjádřena vztahem

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

kde  $p^2$  je frekvence dominantního homozygota **AA**,  $q^2$  je frekvence recesivního homozygota **aa**,  $2pq$  je frekvence heterozygotů **Aa** a **aA**.

- 3) Pokud je daná populace Hardy-Weinbergova, bude Hardy-Weinbergovy rovnováhy dosaženo již po jedné generaci panmiktického křížení.

### 1.1.3 Mechanismy ovlivňující Hardyho-Weinbergovu rovnováhu v populaci

Reálné populace se však od modelové Hardy-Weinbergovy populace mohou lišit. Modelová Hardy-Weinbergova populace je ve výzkumech brána jako nulová hypotéza. Vzhledem k absenci mutací, selekce a jiných evolučních principů je modelová Hardy-Weinbergova populace evolučně stabilní (nevyvíjí se). Odchyluje-li se zkoumaná populace významně od populace Hardy-Weinbergovy, znamená to, že na ni působí zmíněné evoluční principy (Wittke-Thompson JK, *et al.* 2005).

Přirozená populace běžně podléhá mutacím, které mohou být pro jedince prospěšné, škodlivé, anebo jsou neutrální. V důsledku působení mutací na populaci na ni také působí

selekce, jinak řečeno – populace podléhá selekčnímu tlaku (Sabeti PC, *et al.* 2006). Populace jsou také omezené ve velikosti a běžně se u nich vyskytuje náhodný genetický posun (genetický drift). Dále také nemusí platit podmínka náhodného oplození. V polymorfních populacích může určitý morf být dočasně reprodukčně úspěšnější než jiné. V neposlední řadě může populaci ovlivňovat migrace nebo tok genů.

### 1.1.3.1 Selektce a selekční tlak

Pro selekci je důležitý index reprodukční zdatnosti (**fitness**). Fitness ukazuje průměrný příspěvek genetické informace od jedinců s určitým genotypem do populace v průběhu generací (Yang Z, *et al.* 2000). Hlavními komponenty fitness jsou celkový počet narozených mláďat a kvalita potomstva porovnávána vůči jedincům s odlišným genotypem. Porovnáváme-li mezi sebou různé genotypy v populaci, hledáme hodnoty **relativního fitness**, které může nabývat hodnoty na intervalu [0; 1]. Hodnoty 1 přitom vykazují relativní fitness nejzdatnějšího genotypu, hodnoty blízké 0 naopak vykazují relativní fitness málo zdatných genotypů (O. Savolainen, *et al.* 2007).

Selektce vytváří na populaci selekční tlak. Jedno z mnoha možných dělení selektce je rozdělení na selekci pozitivní, negativní. Pozitivní selektce působí na alely, zvyšující fitness jedince, jejím důsledkem je navýšení frekvence této alely, dokud nedojde k jejímu upevnění (zafixování) (Sabeti PC, *et al.* 2006). Negativní selektce naopak působí na alely, které fitness jedince snižují, důsledkem jejího tlaku pak je snížení frekvence této alely. Nejsilněji působí negativní selektce na škodlivé mutace v kódujících oblastech DNA (M. G. Kidwell, 2005). Působením selekčního tlaku se tedy frekvence alel jedinců s malým relativním fitness v populaci snižují, a frekvence alel jedinců s nejvyššími relativními fitness se naopak zvyšují. Alely, které nemají projev na fenotyp jedince se nazývají selekčně neutrální. Mezi selekčně neutrální alely patří i mikrosatelity (J. Flegr, 2007).

### 1.1.3.2 Náhodný genetický posun (genetický drift)

Při předávání genetické informace do následující generace v diploidní populaci záleží z části na náhodě (R. Lande, 1976 & K. Harris, 2018). Genetická informace diploidních rodičů se náhodně rozdělí do haploidních gamet a ty se poté spojují. Výsledkem je genotyp jedince, který obsahuje genetickou informaci mateřskou i otcovskou. Náhoda při vzniku gamet a jejich spojování je jeden z důvodů genetického driftu. Sledujeme-li například výskyt neutrální alely **A** v genofondu populace, jejíž frekvence na začátku pozorování byla 0,5, budeme pozorovat drobné odchylky od hodnoty 0,5. Tyto odchylky se zároveň hromadí – jsou kumulativní (R. Lande, 1976).

Máme-li populaci, kde se vyskytuje 500 jedinců s alelou **A** a 500 jedinců s alelou **B**, je frekvence obou alel 0,5. V důsledku náhodného výběru gamet však v další generaci sledujeme pouze 480 jedinců s alelou **A** a 520 jedinců s alelou **B**. V dalších generacích budou frekvence dále kolísat, ale protože jedinců s alelou **B** je nyní v populaci více, než jedinců s alelou **A**, je pravděpodobnější, že v další generaci zůstane alela **B** častěji se

vyskytující alelou, neboť méně jedinců předávalo do další generace alelu **A**. Toto kolísání frekvencí alel mezi generacemi nakonec vede k upevnění (zafixování) jedné alely a vyhnutí (extinkci) druhé (C.-H. Kuo, *et al.* 2009). Rychlost fixace či extinkce alel je závislá na velikosti populace. Čím menší je populace, u níž se genetický drift vyskytuje, tím je jakákoliv odchylka od rovnováhy mezi alelami citelnější (C.-H. Kuo, *et al.* 2009). Lze tedy sumarizovat, že u menších populací dochází k fixaci, případně extinkci alel rychleji než u populací velkých.

## 1.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity neboli v angličtině short tandem repeats (STR), simple sequence repeats (SSR) nebo variable number of tandem repeats (VNTR), jsou tandemově se opakující úseky (tandemové repetice) na DNA, vyskytující se téměř ve všech organismech na Zemi (Chauhan T., 2019). Vzhledem k DNA jsou definovány jako nekódující oblasti, tedy takové oblasti, které jsou označovány pojmem neproteinotvorné a nedrží informace o syntéze proteinů. Přestože hlavním úkolem DNA je ukládání a přenos informace o syntéze proteinů, velká část DNA eukaryotických organismů se skládá právě z neproteinotvorných oblastí, mezi které řadíme, mimo jiné, i mikrosatelity. Mikrosatelity se v organismu nachází zpravidla ve velkém množství (v lidském genomu 3–4 % z celkového genomu), jejich funkce však zůstává nejasná (Y.-C. Li, *et al.* 2004). Přestože je funkce mikrosatelitů pro organismus neznámá, jsou velmi užitečné při výzkumných pracích, například při forenzní analýze nebo testování DNA (zkoumání příbuzenských vztahů, určování paternity atd.) (Queller DC, *et al.* 1993).

Vysoká variabilita mikrosatelitů je důsledkem velmi vysoké mutační rychlosti jednotlivých mikrosatelitů, s ohledem na jiné, kódující, části DNA (Fan, H., & Chu, J. Y., 2007). Vysoká mutační rychlost potom vede k velké rozmanitosti mikrosatelitů, stejně tak jako k velké specifičnosti lokusu u daného druhu (B. Brinkmann, *et al.* 1998). Tato velká rozmanitost nám dovoluje zkoumat genetickou variabilitu mezi jednotlivými druhy, či jedinci v daném druhu nebo populaci. Výsledky takového zkoumání pak může být právě určení příbuzenských vztahů či paternity.

### 1.2.1 Struktura mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou tandemové repetice jedné až desíti párů bází, nejčastěji však 2–6 párů. Taková repetice se potom může opakovat až 50krát; celková délka mikrosatelitu se nachází mezi 100–120 bázovými páry (Chauhan T., 2019). Mikrosatelity podle počtu repetic bázových párů dělíme na dinukleotidové (u obratlovců jsou nejběžnější repetice  $(AC)_n$  nebo  $(AT)_n$ , kde  $n$  značí počet repetic), trinukleotidové (u obratlovců nejběžnější  $(AAT)_n$  nebo  $(AGG)_n$ ), tetranukleotidové (u obratlovců nejčastější  $(AGAT)_n$  nebo  $(ACAG)_n$ ) atd. (G. Toth, *et al.* 2000).

Jiný způsob klasifikace mikrosatelitů je podle struktury repetic. Tento způsob dělí mikrosatelity na dokonalé (perfect), kde dochází k repetici bázových párů bez přerušení či mutací a na nedokonalé (imperfect), kde dochází k nepravidelnému narušení repetice, způsobeném například mutací, po kterém ovšem dále standardně pokračují. Speciálním případem jsou repetice přerušované (interrupted). V tomto případě je pravidelná repetice opět narušena (jako u nedokonalé repetice), ale narušení není, jako v případě nedokonalé repetice, ojedinělé či nepravidelné, ale jedná se vždy o stejný bázový pár, který se v mikrosatelitu opakuje pravidelně (nahrazuje repetice v pravidelných intervalech) (Fan, H., & Chu, J. Y., 2007).

Nejčastější bázi vyskytující se v mikrosatelitech je adenin, což je další z důvodů, proč jsou mikrosatelity používány při laboratorních analýzách, neboť díky struktuře své vazby (méně vodíkových můstků) jsou adenin a thymin snazší pro replikaci při PCR, než guanin a cytosin (Chauhan T., 2019).

### 1.2.2 Mutace mikrosatelitů

K mutaci v mikrosatelitech dochází častěji ( $10^{-6}$ – $10^{-2}$  mutací bázeových párů za generaci) než v jiných částech DNA (zhruba  $10^{-9}$  mutací bázeových párů za generaci) (Fan, H., & Chu, J. Y., 2007). Vysoká mutační rychlost má za důsledek vysokou variabilitu mikrosatelitů, která je významná pro laboratorní analýzu a práci (například při identifikaci jedince se jedinečnost mikrosatelitů využívá u tzv. DNA fingerprinting). Mutace mohou být způsobeny více důvody – mezi hlavní důvody patří: nerovnoměrný crossing-over v meióze a skluz vlákna DNA při replikaci (Fan, H., & Chu, J. Y., 2007).

K nerovnoměrnému crossing-overu dochází při crossing-overu s nepřesně spárovanými chromozomovými vlákny. Důvodem mohou být dlouhé, tandemově se opakující sekvence, které mohou způsobit špatné určení místa zápisu mezi dvěma vlákny DNA. Výsledkem pak jsou delece nebo inserce na jednom vlákně (Smith, G., 1976).

Skluz vlákna DNA během replikace je považován za hlavní důvod mikrosatelitového mutačního procesu (Fan, H., & Chu, J. Y., 2007). Skluz vlákna DNA je při replikaci běžným jevem – k mutacím dochází pouze tehdy, nasedne-li vlákno DNA po skluzu na špatné místo. Tento jev je daleko více pravděpodobný u mikrosatelitů než u jiných oblastí DNA právě díky mikrosatelitové struktuře (B. Harr, *et al.* 2000). Dojde-li při replikaci DNA ke skluzu jednoho z vláken právě ve chvíli, kdy se replikuje mikrosatelit, může vlákno DNA nasednout na špatnou repetici daného mikrosatelitu. Tento jev se vyskytuje častěji u mikrosatelitů, protože se jedná o tandemové repetice, které zvyšují pravděpodobnost špatného znovu-napojení řetězce (B. Harr, *et al.* 2000). Výsledkem skluzu je potom delece jedné či více repetic mikrosatelitu, pokud vláknem, které sklouzlo, je vlákno replikované, nebo adice jedné či více repetic mikrosatelitu, pokud ke skluzu došlo na vlákně syntetizovaném. Nejčastěji ke skluzu dochází na repeticích dinukleotidových, nejméně často pak na repeticích tetranukleotidových (hodnoceny byly pouze di-, tri- a tetranukleotidové repetice) (Kruglyak, *et al.* 1998).

Mimo tyto hlavní mechanismy mutací mohou rychlost mutace ovlivnit i další faktory. Jedním z takových faktorů je délka mikrosatelitu, tedy počet repetic. Čím více repetic mikrosatelit obsahuje, tím pravděpodobněji zmutuje (Fan, H., & Chu, J. Y., 2007). Rychlost mutace může být ovlivněna i pohlavím. Spermie podléhají více DNA replikacím než vajíčka a čím více replikací buňka zažije, tím vyšší je frekvence jejích mutací (Shimmin, L.C., *et al.* 1993). V neposlední řadě je zde faktor věku. Například počet vykonaných mitóz při spermatogenezi je ve 28 letech zhruba 380 a ve 35 letech zhruba 540. U mužů se tedy i věk se dá považovat za faktor rychlosti mutace mikrosatelitů (Kayser, M., *et al.* 2000 & Brinkmann, B., *et al.* 1998).

### 1.2.3 Nulové alely

Nulové alely jsou jedním z jevů, které komplikují přesné určení příbuznosti mezi jedinci. Nulovou alelou nazýváme takovou alelu, která není při polymerázové řetězové reakci (PCR) amplifikována (D. F. Callen, *et al.* 1993). Pro následnou analýzu ji tedy nemáme k dispozici a zůstává skryta. Důvodem vzniku nulové alely jsou převážně mutace, a to mutace nikoliv na alele (v našem případě mikrosatelitu) samotné, ale na jejím okolí (tzv. **flanking regions**) (Dakin EE & Avise JC, 2004). Okolí mikrosatelitu je oblast v okolí alely, na kterou při provádění PCR nasedá primer. Je-li toto okolí námi sledované alely poškozeno, nebo jinak změněno, tak se na něj navrhnutý primer není schopen navázat a tato alela není při PCR amplifikována (M. P. Chapuis & A. Estoup, 2007). Mezi mutace, které mohou vytvořit nulovou alelu patří adice či delece, nebo jednonuklotidové polymorfismy (SNPs) (D. F. Callen, *et al.* 1993).

Nulové alely jsou běžným jevem, jehož důsledkem může být, mimo jiné, odchýlení od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Konkrétně nulové alely způsobují pokles pozorované heterozygocity alely při ověřování platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy (D. F. Callen, *et al.* 1993).



### 1.3 Vznik zbarvení u plazů

Světlo, které dopadá na pokožku plazů, prochází několika vrstvami. Tyto vrstvy obsahují pigmentové buňky (**chromatofory**), které část světelného spektra pohltní a jinou část naopak odráží (M. Fingerman, 1965). Výsledkem funkce těchto buněk je konečná barva jedince. Zbarvení jedinců u plazů je velmi různorodé, odlišné formy zbarvení lze sledovat například mezi jednotlivými podřády třídy *Reptilia* anebo mezi jednotlivými jedinci ze stejné populace (Olsson M., *et al.* 2013).

V první vrstvě pokožky plazů se nacházejí chromatoforové buňky **xantofory**. Xantofory pohlcnou světlo dlouhých vlnových délek, od žluté po červenou (Macedonia JM, *et al.* 2000). Světlo samotné pohlcnou pigmenty, které xantofory obsahují. Mezi nejznámější pigmenty, pohlcnující dlouhé vlnové délky patří karotenoidy nebo pteridiny (Macedonia JM, *et al.* 2000). Poměr pohlčení světla je přímo úměrně závislý na frekvenci xantoforů. Vyšší frekvence xantoforů znamená větší poměr pohlčeného světla dlouhé vlnové délky a barvy tohoto světelného spektra pak nebudou přítomny v zbarvení jedince. Naopak nízká frekvence xantoforů znamená menší pohlčení dlouhých vlnových délek a větší zastoupení těchto barev v zbarvení jedince (Olsson M., *et al.* 2013).

Světlo tedy prochází vrstvou xantoforů do další vrstvy. Ta obsahuje **iridofory**, které obsahují purinové krystalky, většinou guaninu (Morrison RL, *et al.* 1996). Iridofory odrážejí specifickou vlnovou délku a jsou tak zodpovědné za barvu, kterou u jedince pozorujeme. Pokud první vrstva xantoforů nepohltila mnoho světla dlouhých frekvencí, budou tyto dlouhé frekvence odráženy iridofory, což bude mít za následek zbarvení jedince ve žlutém až červeném spektru. Pokud jsou naopak dlouhé vlnové délky pohlcneny hustou vrstvou xantoforů, zbylé vlnové délky budou iridofory odráženy (Olsson M., *et al.* 2013). Iridofory také ovlivňují odráženou vlnovou délku, která je závislá na jejich koncentraci a velikosti (Olsson M., *et al.* 2013) anebo také na teplotě okolí (Morrison RL, *et al.* 1996).

Po odražení specifického světla iridofory putuje světlo do poslední vrstvy a tou je vrstva **melanoforů**. Melanofory obsahují převážně černý pigment eumelanin, který pohlcuje zbytek světelného spektra, které prošlo vrstvami xantoforů a iridoforů (Olsson M., *et al.* 2013). Na rozdíl od předchozích vrstev neovlivňuje tato vrstva zbarvení jedince (skrze pohlčení nebo odrážení specifických vlnových délek), ale ovlivňuje sytost barvy. Větší koncentrace melanoforů má za následek sytější barvu jedince, nižší koncentrace melanoforů naopak vyvolává vybledlejší a nevýrazné zbarvení (Olsson M., *et al.* 2013).

### 1.3.1 Barevný polymorfismus

Barevnost a barevné formy mají v populaci často velký význam. Může se jednat o vyjádření postavení jedince v sociální struktuře, může hrát význam ve výběru partnera (Sinervo B., *et al.* 2001) nebo může vyjadřovat odolnost vůči parazitům (Calisi RM, *et al.* 2008). V populacích tak dochází k poměrně častému jevu – **polymorfismu**. Polymorfismus znamená výskyt jedinců různých forem v jedné populaci (Ford EB, 1945). Jedním z příkladů polymorfismu jsou odlišná zbarvení a různé barevné formy. Samotné barevné formy pak bývají označovány pojmem **morf**. Důvodem vzniku odlišných barevných forem, tedy morfů, ve stejné populaci může být například časem se měnící reprodukční taktika. Různé morfy jsou v daném časovém intervalu dominantní, ale postupně jsou nahrazovány morphem jiným (Sinervo B., & Lively CM, 1996).

Jiným příkladem polymorfismu je výzkum E. L. Hovera (1985), který sledoval barevné formy u ještěra *Urosaurus ornatus*. Zaměřil se u něj dva časté morfy – jedince se zelenými a jedince s oranžovými hrdly. Různé barevné formy však měly jiné důsledky na sociální chování nebo schopnosti jedince. Jedinci se zeleným hrdlem častěji vyhrávali souboje se stejně velkým jedincem s oranžovým hrdlem, naopak jedinci s oranžovým hrdlem agresivněji bránili své teritorium a častěji útočili na vetřelce.

Jiný výzkum (Olsson M., 1994) zkoumal „svatební šat“ – tedy zbarvení jedinců při hledání partnera. Olsson pozoroval odlišnou sytost barev jedinců – barevněji sytější jedinci byli většinou větších rozměrů a častěji vyhrávali souboje o partnera než jedinci s méně sytou barvou.

V populacích tedy polymorfismus vůbec není vzácným jevem a je důležitým faktorem v sociální struktuře dané populace. Vyskytuje se také u našich vzorků, kde pozorujeme celkem čtyři různé barevné formy – „concolor“, „typica“, „erythronota“ a „immaculata“.

Z předchozích studií však nevyplývalo jasně, zda je zbarvení děděno, anebo zda je vytvářeno tlakem okolního prostředí. Na základě výzkumů – C. W. Thompson & M.C. Moore (1992) nepozorovali změnu hladiny testosteronu při změně chování dospělých samců, D. K. Hews, *et al.* (1994) sledovali vztah dvou různých morfů a jejich velikosti s aplikací testosteronu, a spouště dalších bylo stanoveno, že různé barevné morfy jsou určeny geneticky, a nikoliv tlakem prostředí (Olsson M., *et al.* 2013). Pro ještěrku obecnou, *Lacerta agilis*, však nejsou v současnosti známe geny ani způsoby, kterými se zbarvení jedinců dědí.

## 1.4 Mutační modely

Pomocí počtu repetit na vybraných mikrosatelitech můžeme určit, zdali jsou si jedinci příbuzní a také jak blízce jsou si příbuzní. Určujeme-li však příbuznost dvou nebo více jedinců za použití mikrosatelitů, je třeba dbát na mutace, kterým mikrosatelity podléhají. Například proběhne-li na sledovaném mikrosatelitu mutace, jejíž výsledkem bude adice tří repetit ke sledovanému mikrosatelitu a u příbuzného jedince tato mutace neproběhne, pouhým porovnáním mikrosatelitů bychom mohli dojít k mylnému závěru, totiž že dva sledovaní jedinci si nejsou příbuzní. Mutační modely zohledňují výskyt mutací a jejich vliv na pozorovanou genetickou variabilitu.

### 1.4.1 Model nekonečných alel (Infinite Alleles model)

Model nekonečných alel (IA model) předpokládá, že při vytváření nové alely pro každou mutaci bude průměrný počet alel na generaci neustále stoupat a limitně se blížit nekonečnu (Ewens WJ, 2016). V modelu zároveň nepůsobí homoplasie, neboť pravděpodobnost, že zmutovaná alela zmutuje do stejné podoby jako jiná alela, je nulová (předpoklad IA modelu to zakazuje – nejedná se o mutaci, díky které by vznikala nová alela). Zároveň platí, že identické alely jsou identické na základě dědičnosti (**identical by descent, IBD**), a tedy, že jedinci s identickými alelami nutně musí mít společného předka (opět způsobeno stejným předpokladem). Čím více alel mají tedy jedinci společných, tím je větší pravděpodobnost, že jsou blízce příbuzní a naopak – jedinci s málo společnými alelami jsou s větší pravděpodobností velmi vzdálení příbuzní (ovšem jestliže mají alespoň jednu alelu identickou, pak stále musejí mít společného předka) (M. Kimura & J. Crow, 1964).

Model nekonečných alel předpokládá tři možnosti mutací, rozlišené podle selekčního tlaku (M. Kimura & J. Crow, 1964). Model se přizpůsobuje přítomnosti či absenci selekčního tlaku a má jiný výpočetní tvar podle předpokladů:

- 1) Na alely nepůsobí selekční tlak a mutace jsou neutrální, tedy nejsou jedinci ani škodlivé, ani prospěšné; frekvence alel jsou určeny rychlostí mutace a náhodným genetickým driftem.
- 2) Na alely působí selekční tlak, ale mutace jsou pouze neutrální nebo prospěšné.
- 3) Na alely působí selekční tlak a mutace jsou neutrální, škodlivé i prospěšné.

Základním předpokladem IA modelu je stálá mutační rychlost  $\mu$ , a pokud se mutace uskuteční, vede k vytvoření zcela nového mutanta, který se v populaci nevyskytuje, ani se v minulosti nevyskytoval. Toto kritérium je splněno za předpokladu, že populace je dostatečně velká. Za těchto předpokladů je potom vzorec

$$F = \frac{1}{4N_e \cdot \mu + 1}$$

vzorcem pro výpočet IA modelu pro selektivně neutrální alely,  $\mu$  je mutační rychlost,  $N_e$  je efektivní velikost populace.  $F$  je potom statistika, udávající průměrný podíl homozygotů v celkové efektivní populaci (M. Kimura & J. Crow, 1964). Tento vzorec lze aplikovat na počty s mikrosatelity, neboť i mikrosatelity se řadí mezi selektivně neutrální alely.

Efektivní velikost populace vyjadřuje počet jedinců, kteří přispívají svou genetickou informací do následující generace neboli počet jedinců, kteří zachovávají genetickou variabilitu populace (Primack RB, *et al.* 2001). Za předpokladu, že v populaci nejsou pohlaví rozdělena v poměru 1:1, lze efektivní velikost populace vypočítat vzorcem

$$N_e = \frac{4N_m \cdot N_f}{N_m + N_f}$$

kde  $N_m$  je počet samců v populaci,  $N_f$  je počet samic v populaci (A. Caballero, 1994).

Mezi hlavní nedostatky IA modelu patří stálá mutační rychlost, která je v populacích běžně proměnná a ovlivňovaná vnějšími faktory, a fakt, že model nerozlišuje mezi alelami, v kterých proběhla mutace (Kimura & Crow 1964). Příbuznost je tedy vypočítávána pouze z identických alel a k bližšímu určení příbuznosti pomocí odlišných alel tento model nelze použít. Protože každá mutace vede ke vzniku nové alely, nelze v modelu rozlišit, zda se jednalo o adici 3 repetice k mikrosatelitu, delecí 8 repetice mikrosatelitu, anebo pouze o změnu o délce jedné repetice. Předpoklad modelu také znamená, že může vzniknout nekonečně mnoho variant alel, což je teoretický a v reálných datech nerealistický předpoklad.

Menší nevýhodou je také absence možnosti zařadit do výpočtů působení homoplasie, která je v populacích sledovaným jevem. Jedná se o jev, kdy různí jedinci dojdou ke stejnému alelickému složení nezávisle na sobě (konkrétním příkladem pro mikrosatelity je počet repetice). Problematickou se homoplasie může stát při vysoké mutační rychlosti (A. Estoup, *et al.* 2002). V našich datech je však homoplasie zanedbatelná, neboť pro její výskyt jsou potřebné minimálně tři po sobě jdoucí generace. V našich datech se vyskytují jedinci celkem tří generací, přičemž největší počet jedinců se vyskytuje v první a druhé generaci, mezi kterými homoplasii nelze sledovat.

#### 1.4.2 Krokový model (Stepwise Mutation model)

Krokový model (SM model) model se od IA modelu liší hlavně průměrným počtem alel na generaci. Na rozdíl od IA modelu, kde roste nekonečně, se průměrný počet alel v SM modelu po nějaké době ustálí, a to i za předpokladu, že růst populace není omezen. Podmínkou SM modelu je stálý součin efektivní velikosti populace a mutační rychlosti (M. Kimura & T. Ohta, 1978).

Krokový model model předpokládá, že mutace probíhají za stálé mutační rychlosti  $\mu$  a za mutaci považuje delecí nebo adici jedné repetice mikrosatelitu (M. Kimura & T. Ohta,

1978). Pravděpodobnost adice i delece repetice je stejná a je rovna  $\mu/2$ . Příbuznost alel je tak dána rozdílem v počtu repetic daného mikrosatelitu. Pokud je rozdíl v počtu repetic mikrosatelitu malý, můžeme jedince považovat za blízce příbuzné. Je-li rozdíl v počtu repetic větší, můžeme předpokládat vzdálenější příbuznost.

Jedním z teoretických problémů SM modelu je homoplasie. Jelikož neplatí, že identické alely jsou pouze IBD, mohli bychom pokládat dva jedince s identickými alelami za příbuznější, než ve skutečnosti jsou. Ve skutečnosti se však může jednat o homoplasii. Podobně jako u IA modelu platí, že problém homoplasie na naše data nemá významný vliv.

Modelem derivovaným z SM modelu je tzv. dvoufázový model (Two Phase Model, TP). Jedná se o model, který umožňuje posun až o dvě repetiční jednotky, tedy i o dvě adice či delece repetice (R. Sainudiin, *et al.* 2004). Derivovaných TP modelů je více a každý přistupuje jinak k problému počtu repetičních jednotek. Některé derivované TP modely berou v potaz pouze posun o dvě repetiční jednotky, jiný model přisuzuje změně o jednu repetiční jednotku pravděpodobnost  $p$  a změně o dvě repetiční jednotky pravděpodobnost  $(1-p)$ , další model dovoluje i změnu o až  $k$  repetičních jednotek, kde tyto změny podléhají geometrickému rozdělení (R. Sainudiin, *et al.* 2004). Cílem těchto modelů bylo nalézt model, který by popisoval realitu lépe než SM model. Nepodařilo se však dokázat, že tyto TP modely vedou k prokazatelně přesnějším výsledkům než výsledky z SM modelu (R. Sainudiin, *et al.* 2004).

## 1.5 Cíle práce

Analýzou mikrosatelitů se zvolením vhodného mutačního modelu určit příbuznost v populaci *Lacerta agilis* a na základě příbuznosti ukázat, zda je některá barevná forma reprodukčně úspěšnější.

## 2 Metodika

Vzorky byly odebrány z jedinců druhu *Lacerta agilis* celkem ze tří lokací – Hustopeče, oblast Opavska (Opava a Vítkov) a Jihlavska (město Jihlava, dvě různé lokace) (Obr. 2). Hlavní typ vzorků byly konce ocásků, články prstů v 96 % etanolu a v případě úhynu celí jedinci uchovávaní při -20°C. Vzorky byly udržovány ve vhodných podmínkách a teplotě na detašovaném pracovišti Ústavu biologie obratlovců ČAV ve Studenci.



Obr. 2: Lokace odběru vzorků ještěrky obecné *Lacerta agilis*

K izolaci DNA ze vzorků byla využit izolační kit Exgene Tissue SV plus mini (GeneAid, Seoul, Korea). Po izolaci DNA byly aplikovány primery seskupené do multiplexu a proběhla polymerázová řetězová reakce (PCR). Během PCR nasednou primery na požadované místo na DNA a napojí polymerázu, která replikuje úseky obsahující vybrané mikrosatelity. Replikované části DNA se po ukončení replikace odpojí od mateřského vlákna a samy se stávají předmětem replikace. Takto provedená replikace se nazývá amplifikace a její produkty amplikóny.

Délka produktu PCR byla následně změřena kapilární elektroforézou na sekvenátoru ABI 3130 XL (Applied Biosystems). Jako velikostní standard byl použit GeneScan 500 LIZ (Life Technologies, Warrington, UK). Alely byly určeny z délky PCR produktu pro každý lokus a jedince.

Výsledkem laboratorní práce byla datová tabulka obsahující identifikační číslo jedince, jeho předpokládaný rok narození a výskyt jednotlivých alel pro studované lokusy. Celkem byly analyzovány vzorky ze 157 jedinců – z toho 144 z Hustopečí, 9 z Opavska a 4 z Jihlavska. Předpokládané roky narození byly 2018, 2019 a 2020. Analyzováno bylo celkem 5 lokusů LA01, LA02, LA27, LA40 a LA55. (Tab. 1, Tab. 2)

Pro kohorty tvořené předpokládaným rokem narození a také pro kohorty tvořené místem výskytu jedinců byl proveden test na Hardy-Weinbergovu rovnováhu. Na základě frekvencí výskytu jednotlivých alel byla pro každý lokus vypočtena očekávaná heterozygocita a porovnávána s pozorovanou heterozygocitou. Na porovnání očekávaných a pozorovaných hodnot byl použit  $\chi^2$  test. Pro výpočet očekávaných hodnot a  $\chi^2$  test byl použit program RStudio (RStudio Team, 2019) a funkce z balíčků „adegenet“ a „pegas“ (Thibaut Lombard, *et al.* 2020).

K analýze příbuznosti byl zvolen model **IBD**, který dobře koresponduje se získanými daty. K dispozici je malý počet jedinců a jsou zkoumáni na krátkém časovém intervalu. Vzhledem k těmto vlastnostem datového souboru lze usoudit, že pravděpodobnost mutace na sledovaných lokusech je dostatečně malá, aby se dala aplikovat metoda IBD.

Podle modelu IBD byla vypočítána příbuznost pro všechny jedince. Jako metrika pro příbuznost byla zvolena Wangova metrika, která porovnává jedince párově (tedy stylem „každý s každým“) a přiřadí každému takto vzniklému páru jedinců hodnotu, reprezentující jejich vzájemnou příbuznost. Podle J. Wanga (2017) může být příbuznost definována jako pravděpodobnost IBD, kdy nabývá hodnot na intervalu [0; 1], anebo jako korelační koeficient, v tomto případě může nabývat hodnot z intervalu [-1; 1]. Wang doporučuje u analýzy mikrosatelitů použít příbuznost jako korelační koeficient, neboť se většinou odkazuje právě na populaci, u které je příbuznost odhadována. Při práci s daty se tedy s příbuzností operuje jako s korelačním koeficientem a v distanční matici se vyskytují také záporné hodnoty. Tyto záporné hodnoty podle Wanga značí menší než průměrnou příbuznost, nulové hodnoty znamenají zcela průměrnou příbuznost, a pozitivní hodnoty ukazují na jedince, u nichž je příbuznost vyšší než průměrná. K analýze příbuznosti byl použit program RStudio a funkce z balíčku „related“ (Tim Frasier, 2018).

Na základě příbuznosti vyjádřené korelačními koeficienty podle Wanga (dále jenom příbuznost) byli analyzováni jedinci, kteří byli rozděleni do kohort podle předpokládaného roku narození. Zkoumána byla střední hodnota příbuznosti a její rozptyl, zobrazený pomocí krabicového grafu. Dále byli jedinci seřazeni do skupin porovnávajících mezi sebou příbuznosti jednotlivých kohort. Tímto způsobem vznikly tři nové kohorty – 2018×2019, 2018×2020 a 2019×2020, kde jednotlivá čísla reprezentují předpokládaný rok narození.

Zkoumána byla také frekvence alel na jednotlivých lokusech, u jedinců vyskytujících se v Hustopeči v jednotlivých kohortách. Cílem porovnání bylo sledovat, zda určité alely převládají nad ostatními, nebo zda se některé alely vytrácejí z populace. K analýze byl použit program RStudio.

Za použití matice příbuznosti a popsání barevných forem byla analyzována celková příbuznost v a mezi jednotlivými morfy. Mezi příbuznostmi jednotlivých barevných forem byl proveden Kruskal-Wallisův test pro nalezení významných odchylek mezi příbuznostmi jednotlivých barevných forem. K oběma analýzám byl použit program RStudio.

Podle příbuznosti byli vybráni odpovídající jedinci, jejichž hodnota příbuznosti odpovídá vztahu rodič-potomek. Možný vztah rodič-potomek byl přisuzován pouze jedincům z kohort 2018 a 2020 (podle cyklu rozmnožování) a ze stejné lokality. Podle dostupných dat barevných forem potenciálních rodičů byl vytvořen poměr jejich barevných forem a tento poměr byl vytvořen i ze všech dostupných jedinců. Tyto dva poměry byly porovnány Pearsonovým  $\chi^2$  testem, aby se dalo posoudit, zda poměry rodičovských barevných forem odpovídají rozdělení barevných forem v populaci. Vytvoření poměrů a Pearsonův  $\chi^2$  test byl proveden v programu RStudio.



### 3 Výsledky

V Hustopečích bylo zkoumáno 144 jedinců a sledovaný počet jejich alel se pohyboval v rozmezí 8–20 alel na lokus, u Opavska 9 jedinců a počet alel 5–8 a u Jihlavska 4 jedinci a počet alel 2–7 (Tab. 1). Alelický rozsah byl u jedinců z Hustopeče u každého lokusu nejvyšší, ve všech lokalitách nejnižších hodnot dosahovaly alely lokusu LA01 a nejvyšších hodnot dosahovaly alely lokusu LA02. U všech lokalit a lokusů byla vypočítána očekávaná a pozorovaná heterozygocita,  $\chi^2$  testem byly tyto dvě hodnoty porovnávány.

**Tab. 1: Charakteristika mikrosatelitů ještěrky obecné na lokalitách v Česku.**  
*H<sub>o</sub>* – očekávaná heterozygocita, *H<sub>e</sub>* – pozorovaná heterozygocita, *df* – stupně volnosti

Lokusy	Počet jedinců	Počet alel	Alelický rozsah	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>p</i> hodnota	<i>df</i>
<b>Hustopeče</b>							
LA01	144	13	79-125	0,81	0,58	<b>0,000</b>	78
LA02	144	14	216-244	0,88	0,88	0,237	91
LA27	144	20	115-163	0,90	0,87	<b>0,038</b>	190
LA40	144	12	185-213	0,79	0,74	<b>0,015</b>	66
LA55	144	8	126-144	0,82	0,88	0,300	28
<b>Opavsko</b>							
LA01	9	8	99-119	0,82	0,67	0,293	28
LA02	9	5	216-240	0,60	0,78	0,124	10
LA27	9	7	115-153	0,70	0,78	0,923	21
LA40	9	5	191-201	0,67	0,67	0,757	10
LA55	9	6	132-146	0,73	0,78	0,582	15
<b>Jihlavsko</b>							
LA01	4	4	107-119	0,72	0,50	0,314	6
LA02	4	6	216-238	0,81	0,75	0,320	15
LA27	4	5	115-141	0,75	0,75	0,649	10
LA40	4	7	191-205	0,84	1,00	1,000	21
LA55	4	2	136-140	0,22	0,25	1,000	1

Platnost Hardy-Weinbergovy rovnováhy u jedinců z Hustopečí zamítáme u lokusů LA01, LA02 a LA40, jejichž *p* hodnoty vyšly menší než stanovená hranice 0,05 (Tab. 1). U lokusů LA27 a LA55 Hardy-Weinbergovu rovnováhu nezamítáme. Pro jedince z Opavska, tedy z města Opavy a Vítkova ani pro jedince z Jihlavska nezamítáme na základě porovnání očekávaných a pozorovaných hodnot heterozygocity platnost Hardy-Weinbergovy rovnováhy. (Tab. 1).

V lokaci Hustopeče byl proveden výpočet Hardy-Weinbergovy rovnováhy i na základě předpokládaného roku narození jedinců. Za rok 2018 a 2019 pouze lokusy LA01 neodpovídal Hardy-Weinbergově rovnováze a lokusy LA02, LA27, LA40 a LA50 Hardy-

Weinbergově rovnováze odpovídaly. Pro jedince narozené v roce 2020 neodpovídaly rovnováze lokusy LA01 a LA40, a naopak lokusy LA02, LA27 a LA55 rovnováze odpovídaly. (Tab. 2)

**Tab. 2: Charakteristika mikrosatelitů ještěrky obecné podle kohort. Statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny tučně.**

*df* – stupně volnosti

Lokusy	$\chi^2$ statistika	<i>p</i> hodnota	<i>df</i>
<b>HWE test 2018</b>			
LA01	109,03	<b>0,000</b>	55
LA02	112,55	0,306	91
LA27	240,90	0,178	190
LA40	41,24	0,223	45
LA55	31,33	0,328	28
<b>HWE test 2019</b>			
LA01	87,91	<b>0,001</b>	45
LA02	74,22	0,070	66
LA27	143,56	0,202	153
LA40	97,77	0,134	45
LA55	34,77	0,058	28
<b>HWE test 2020</b>			
LA01	58,22	<b>0,000</b>	36
LA02	32,59	0,384	36
LA27	95,74	0,072	55
LA40	28,70	<b>0,040</b>	15
LA55	31,30	0,217	28

Při měření frekvencí alel na jednotlivých lokusech na lokusu LA01 alela s délkou 115 výrazně poklesla, z původní hodnoty v generaci z roku 2018 (~0,36) klesla v generaci z roku 2020 až na hodnotu ~0,085. Naopak alela s délkou 109, která měla počáteční hodnotu v generaci z roku 2018 ~0,2, vystoupala v generaci z roku 2020 až na hodnotu ~0,4 – tedy zaznamenala téměř dvojnásobný nárůst. U lokusu LA55 všechny alely zůstávají ve všech kohortách na téměř stejných hodnotách frekvence. (Obr. 3 a Obr. 4)

V analýze střední hodnoty a rozptylu příbuznosti jedinci s předpokládaným rokem narození 2020 měli nejmenší střední hodnotu, ale největší rozptyl. Jedinci z roku 2018 měli nejvyšší střední hodnotu (která však stále byla menší než 0) a jedinci z roku 2019 měli největší rozptyl. (Obr. 5)

Při analýze příbuznosti mezi jednotlivými kohortami měla kohorta 2018×2019 menší průměrnou příbuznost, než kohorta 2018×2020. Kohorta 2019×2020 měla největší naměřenou průměrnou příbuznost a všechny průměrné příbuznosti měly hodnotu menší než 0. (Obr. 6)

Z hlediska barevných forem byli 4 jedinci formy „concolor“, 125 jedinců formy „typica“, 10 jedinců formy „erythronota“ a 1 jedinec formy „immaculata“. Zbývající počet 17 jedinců jsou jedinci s předpokládaným rokem narození 2020 a nejedná se tedy o dospělé jedince, u nichž by se dala jednoznačně určit barevná forma. Jejich barevná forma proto v datovém souboru chybí.

Střední hodnotu příbuznosti s ohledem na rozdělení barevných forem měla forma „concolor“ jako jediná v kladných hodnotách ( $\sim 0,05$ ). Ostatní barevné formy měly střední hodnotu příbuznosti zápornou. (Obr. 7) Kruskal-Wallisův test vyšel významně jen mezi formami „concolor“ a „erythronota“ (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 4,5099$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,034$ ), u porovnávání ostatních skupin vyšla  $p$  hodnota vyšší než 0,05.

Výsledkem výběru jedinců z kohort 2018 a 2020 s vysokou hodnotou příbuznosti bylo celkem 8 jedinců, kteří měli vysokou shodu genetické informace. Jako jedinci s vysokou podobností v genetické informaci byli vybráni jedinci s koeficientem příbuznosti vyšším než 0,5. Pravděpodobných potomků, tedy jedinců z kohorty 2020, bylo v datech dostupných 17. Z 8 potenciálních rodičů bylo 6 označeno barevnou formou „typica“ a 2 zastupovali barevnou formu „concolor“. Samec (jedinec s ID = 327) barevné formy „typica“ měl zároveň vysoký koeficient příbuznosti se třemi jedinci z kohorty 2020, ostatní potenciální rodiče měli vysokou příbuznost pouze s jedním z jedinců kohorty 2020. (Tab. 3)

**Tab. 3: Potenciální rodiče ještěrky obecné a jejich potomci na lokalitě v Hustopečích.**

ID potenciálního rodiče	Barevná forma potenciálního rodiče	ID potenciálního potomka	Koeficient příbuznosti
327	„typica“	495	0,5343
327	„typica“	496	0,6111
327	„typica“	498	0,6111
335	„typica“	497	0,5359
342	„concolor“	517	0,5453
416	„typica“	495	0,5080
430	„typica“	455	0,7074
435	„concolor“	497	0,5125
449	„typica“	521	0,5492
456	„typica“	514	0,5527

Poměru barevných rodičů 6:2 (typica:concolor) a poměru barevných forem celé populace 125:4, porovnávaných Pearsonovým  $\chi^2$  testem, vyšla  $p$  hodnota vyšší než 0,05 (Pearsonův  $\chi^2$  test:  $\chi^2 = 8$ ,  $df = 6$ ,  $p$  hodnota = 0,238).

## 4 Diskuse

Celkem bylo sledováno 157 jedinců a maximální počet alel bylo u lokusu LA27 (celkem 20). V porovnání s ostatními studii se jedná o dostatečný počet. M. Olsson, *et al.* (2010) pro analýzu alel mikrosatelitů v populaci *Lacerta agilis* použili celkem 3967 jedinců na pozorování 21 lokusů. Mezi sledovanými lokusy se nachází i pět lokusů, použitých v naší práci. Alelický rozsah odpovídá našim datům, ačkoliv jeho rozptyl je menší. Ve zmíněné publikaci byla zapsána mimo jiné i pozorovaná heterozygocita, která se pohybovala na intervalu od 0,208 do 0,821. V jiné publikaci (T. S. Schwartz, *et al.* 2008) však bylo jedinců pouze 86. Sledovány byly opět populace ještěrky obecné, *Lacerta agilis*, ovšem analýza se zaměřila pouze na populace, vyskytující se ve Švédsku a Maďarsku. Variabilita byla sledována na 15 lokusech, sledované lokusy opět obsahují všechny lokusy, použité v naší práci. Uváděny jsou hodnoty pozorované a očekávané heterozygocity, společně s informací, zda byla Hardy-Weinbergova rovnováha zamítnuta, či nikoliv. Z 15 lokusů, sledovaných v populacích Švédska i Maďarska (tedy celkem 30 pozorování) se 7 lokusů odchylovalo od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. V porovnání s ostatními publikacemi sledující populace *Lacerta agilis* byl tedy sledován dostatečný počet jedinců (větší počet sledovaných jedinců by zřejmě vedl k přesnějším výsledkům), ovšem počet sledovaných lokusů byl značně menší. V naší analýze zamítáme Hardy-Weinbergovu rovnováhu na třech z 15 případů, což se nezdá být extrémním jevem.

V analýze lokusu LA01, který u žádné ze sledovaných kohort nebyl v Hardy-Weinbergově rovnováze lze předpokládat, že na něj působil selekční tlak nebo populace podléhala vlivu genetického driftu. Dalším z možných faktorů, který ovlivňuje výstupy Hardy-Weinbergovy rovnováhy jsou chyby při genotypování a výskyt nulových alel (D. F. Callen, *et al.* 1993). Je možné, že se u kohort vyskytuje mutace na mikrosatelitovém okolí, kde nasedají primery při amplifikaci lokusu. Mutace v místě nasedání primeru způsobuje nečitelnost mikrosatelitu, v jehož okolí k mutaci došlo (M. P. Chapuis & A. Estoup, 2007). Taková mutace mohla vzniknout u jednotlivců, a potom se dále dědit do dalších kohort. Výsledkem by potom bylo snížení celkové příbuznosti mezi kohortami a následně i větší odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Jediný lokus, u kterého lze uvažovat o celkové platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy je lokus LA55, u kterého rovnováhu nezamítáme ani v jedné ze sledovaných kohort. Ostatní lokusy – LA02, LA27 a LA40 střídaly platnost a neplatnost Hardy-Weinbergovy rovnováhy v různých kohortách. Jedním z důsledků platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy je však fakt, že v populaci, v níž platí Hardy-Weinbergův princip, můžeme tuto rovnováhu pozorovat už po první generaci (A. W. F. Edwards, 2008). To u lokusů LA02, LA27 a LA40 nepozorujeme a můžeme tedy konstatovat, že v těchto lokusech Hardy-Weinbergův princip neplatí. Mezi hlavní důvody neplatnosti Hardy-Weinbergova principu patří selekce a nulové alely, méně potom mutace, kterých nepředpokládáme značné množství, neboť délka pozorování není dostatečně velká na to, aby se mutace stihly významně projevit.

Jedinci s předpokládaným rokem narození 2020 měli v analýze nejvyšší střední hodnotu příbuznosti s porovnáním s ostatními kohortami. Možnou interpretací tedy je, že se v kohortě vyskytuje více příbuzných jedinců anebo že na populaci působí selekční tlak a určité alely jsou častější u více jedinců (u alel LA02 a LA55 však nezamítám Hardy-Weinbergovu rovnováhu a mutace a selekce by tak neměly mít zásadní vliv). Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že při ovzorkování byli vybráni příbuzní jedinci (zřejmě sourozenci). Všichni ovzorkovaní jedinci s předpokládaným rokem narození 2020 byli ovzorkováni v roce 2020, tedy ještě v poměrně mladém věku. Jedinci v raném věku se tedy ještě nerozeběhli z místa narození a v době vzorkování setrvali ve stejném okolí (Vlastimil Baruš, *et al.* 1992).

Při analýze příbuznosti mezi jednotlivými kohortami vyšlo skupině 2018×2020 nejvyšší průměrná příbuznost. Ačkoliv je časové období pozorování příliš krátké na vynášení přesných závěrů, můžeme se pokusit tento jev vysvětlit. Jedním z možných důvodů je reprodukční cyklus ještěrek. Za reprodukčně aktivní jedince se obvykle berou takoví, kteří hibernovali minimálně třikrát (Sven-Åke Berglind, 2000). V oblasti České republiky samci *Lacerta agilis* pak pohlavně dospívají již ve věku dvou let (Vlastimil Baruš, *et al.* 1992). Rozmnožovat se tedy jedinci začínají mezi 2–3 rokem života. Protože průměrná příbuznost mezi jedinci vyšla ve skupině 2018×2020 vyšší než ostatní, můžeme se domnívat, že část jedinců z kohorty 2018 jsou rodiči, a tedy geneticky přispívali do kohorty 2020, což může vysvětlit vyšší průměrnou příbuznost.

V korelační tabulce se vyskytuje 9 párů vzorků, jejichž koeficient příbuznosti je roven jedné. To znamená, že jejich alely na všech pěti lokusech byly identické. U všech párů vzorků bylo podle fotografií jedinců a porovnáváním morfologických znaků dokázáno, že se jedná o stejného jedince odchyceného vícekrát.

Arun Sethuraman (2018) simuloval jaký vliv má na přesnost určení příbuznosti mezi jedinci počet analyzovaných lokusů. Cílem výzkumu bylo dokázat rozdíl mezi analýzou malého a většího počtu lokusů. Jako nejmenší simulovaný počet lokusů uvádí Sethuraman 10 lokusů. Zároveň vztah mezi přesností určené příbuznosti a počtem lokusů je nejlépe reprezentován sigmoidní křivkou (Anna M. Kopps, *et al.* 2015). Můžeme tedy shrnout, že pro získání přesnějších výsledků pro koeficient příbuznosti je upřednostňován větší počet sledovaných lokusů.

Nejvyšší střední hodnoty příbuznosti dosahuje barevná forma „concolor“, což koreluje s faktem, že 2 ze 4 jedinců této barevné formy bylo označeno jako potenciální rodič. V tabulce o potenciálních rodičích a jejich potomcích (Tab. 3) zároveň dochází k jevu, kdy dva jedinci s odlišným ID mají stejného potenciálního potomka. Jedním z možných vysvětlení může být, že tito jedinci jsou oba rodiči uvažovaného potomka. Druhým vysvětlením může být, že sourozenci, u kterých nedošlo k mnoha mutacím. Toto vysvětlení však není velmi pravděpodobné, neboť jedinci se vztahem rodič-potomek mají průměrně příbuznost 0,5 a jedinci se vztahem sourozenec rodiče-potomek rodiče budou mít průměrně příbuznost jen 0,25. Problémoví jedinci jsou ti s ID = 327 a ID = 416, kteří mají vysokou příbuznost se

stejným potenciálním potomkem a jedinci ID = 335 a ID = 435 s tímtež problémem (Tab. 3). U prvního páru se jedná o dva samce, jejichž korelační koeficient příbuznosti je vyšší než 0,5. Je možné, že se jedná dva sourozence. Rodinný vztah však nelze z hodnoty korelačního koeficientu vyčíst. Druhý problémový pár jsou naopak dvě samice, jejichž korelační koeficient příbuznosti je vyšší než 0,4. I u těchto jedinců je možné, že se jedná sourozence. Pokud jsou tito jedinci skutečně sourozenci, vyskytuje se zde problém barevné formy. Obě samice mají totiž jinou barevnou formu a pravděpodobnost tohoto jevu neumíme vyhodnotit, neboť nemáme o dědičnosti barevných forem u druhu *Lacerta lagilis* dostatečnou znalost.

Při provedení Kruskal-Wallisova testu se vyskytla jedna  $p$  hodnota nižší než 0,05, a to u barevných forem „concolor“ a „erythronota“. Na základě tohoto pozorování tedy můžeme konstatovat, že barevná forma „concolor“ je v našich vzorcích reprodukčně úspěšnější než forma „erythronota“ (její střední hodnota příbuznosti byla vyšší). Je však třeba dbát na fakt, že u obou barevných forem se vyskytuje pouze malý počet jedinců („concolor“ – 4, „erythronota“ – 10).

U Pearsonova  $\chi^2$  testu vyšla  $p$  hodnota vyšší než 0,05. Nemůžeme tedy říct, že se poměr jedné barevné formy statisticky významně liší od ostatních forem. V poměrech barevných forem potenciálních rodičů a celé populace tedy není významná odchylka a tyto poměry odpovídají.

## 5 Použitá literatura

- Fan, H., Chu, J.-Y., 2007. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 5, 7–14.. doi:10.1016/s1672-0229(07)60009-6
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371.. doi:10.1007/s004120000089
- Wang, J., 2017. Estimating pairwise relatedness in a small sample of individuals. *Heredity* 119, 302–313.. doi:10.1038/hdy.2017.52
- Wang, J., 2012. An estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. *Genetics* 160, 1203–1215..
- Olsson, M., Stuart-Fox, D., Ballen, C., 2013. Genetics and evolution of colour patterns in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 529–541.. doi:10.1016/j.semcd.2013.04.001
- Morrison, R.L., Sherbrooke, W.C., Frost-Mason, S.K., 1996. Temperature-Sensitive, Physiologically Active Iridophores in the Lizard *Urosaurus ornatus*: An Ultrastructural Analysis of Color Change. *Copeia* 1996, 804.. doi:10.2307/1447641
- Olsson, M., 1994. Nuptial coloration in the sand lizard, *Lacerta agilis*: an intra-sexually selected cue to fighting ability. *Animal Behaviour* 48, 607–613.. doi:10.1006/anbe.1994.1280
- Calisi, R.M., Malone, J.H., Hews, D.K., 2008. Female secondary coloration in the Mexican boulder spiny lizard is associated with nematode load. *Journal of Zoology* 276, 358–367.. doi:10.1111/j.1469-7998.2008.00499.x
- Sinervo, B., Bleay, C., Adamopoulou, C., 2001. SOCIAL CAUSES OF CORRELATIONAL SELECTION AND THE RESOLUTION OF A HERITABLE THROAT COLOR POLYMORPHISM IN A LIZARD. *Evolution* 55, 2040–2052.. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb01320.x
- Hews, D.K., Knapp, R., Moore, M.C., 1994. Early Exposure to Androgens Affects Adult Expression of Alternative Male Types in Tree Lizards. *Hormones and Behavior* 28, 96–115.. doi:10.1006/hbeh.1994.1008
- Thompson, C., 1992. Behavioral and hormonal correlates of alternative reproductive strategies in a polygynous lizard: Tests of the relative plasticity and challenge hypotheses. *Hormones and Behavior* 26, 568–585.. doi:10.1016/0018-506x(92)90023-o
- Chapuis, M.-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621–631.. doi:10.1093/molbev/msl191
- Harris, K., 2018. The randomness that shapes our DNA. *eLife* 7.. doi:10.7554/elife.41491
- Sainudiin, R., Durrett, R.T., Aquadro, C.F., Nielsen, R., 2004. Microsatellite Mutation Models. *Genetics* 168, 383–395.. doi:10.1534/genetics.103.022665

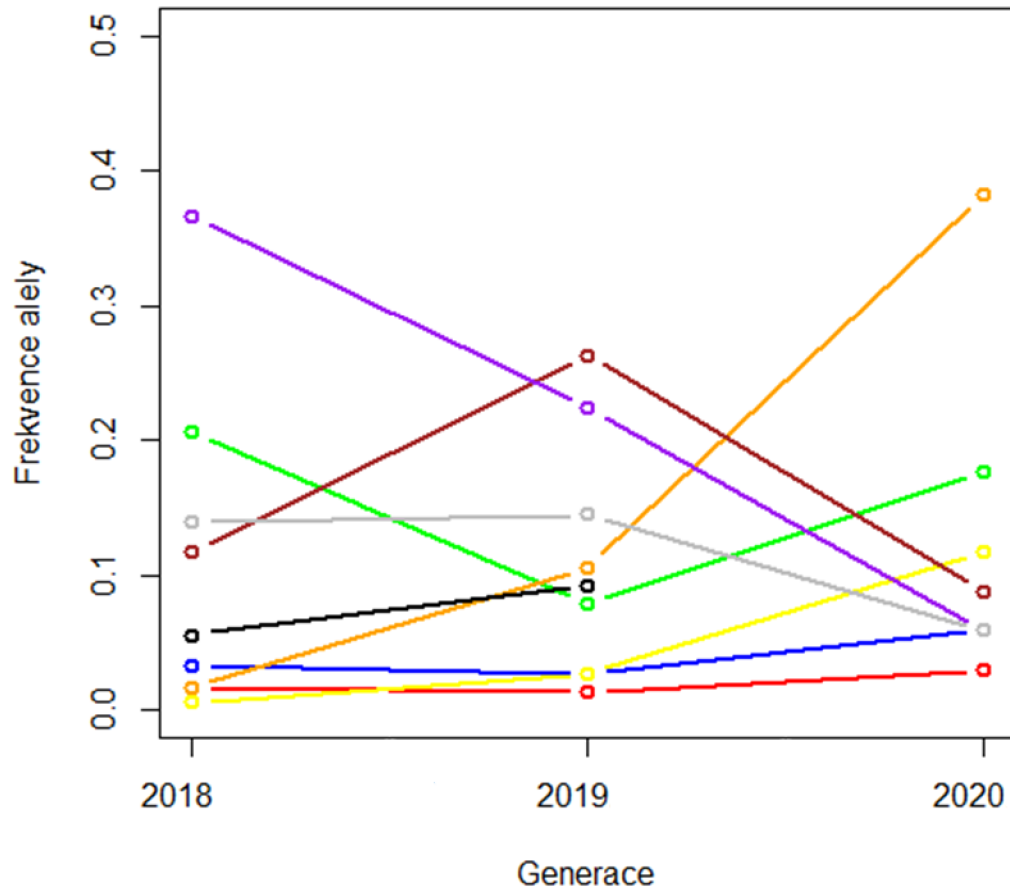
- Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M., Henke, L., Henke, J., Brauer, S., Krüger, C., Krawczak, M., Nagy, M., Dobosz, T., Szibor, R., De Knijff, P., Stoneking, M., Sajantila, A., 2000. Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite Loci from the Human Y Chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs. *The American Journal of Human Genetics* 66, 1580–1588.. doi:10.1086/302905
- Kimura, M., Ohta, T., 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population.. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75, 2868–2872.. doi:10.1073/pnas.75.6.2868
- Cox, D.G., Kraft, P., 2006. Quantification of the Power of Hardy-Weinberg Equilibrium Testing to Detect Genotyping Error. *Human Heredity* 61, 10–14.. doi:10.1159/000091787
- Wittke-Thompson, J.K., Pluzhnikov, A., Cox, N.J., 2005. Rational Inferences about Departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *The American Journal of Human Genetics* 76, 967–986.. doi:10.1086/430507
- Lande, R., 1976. Natural Selection and Random Genetic Drift in Phenotypic Evolution. *Evolution* 30, 314.. doi:10.2307/2407703
- Caballero, A., 1994. Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73, 657–679.. doi:10.1038/hdy.1994.174
- Kuo, C.-H., Moran, N.A., Ochman, H., 2009. The consequences of genetic drift for bacterial genome complexity. *Genome Research* 19, 1450–1454.. doi:10.1101/gr.091785.109
- Li, Y.-C., 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21, 991–1007.. doi:10.1093/molbev/msh073
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8, 285–288.. doi:10.1016/0169-5347(93)90256-o
- Shimmin, L.C., Chang, B.H.-J. and Li, W.-H. (1993) Male-Driven Evolution of Sequences. *Nature*, 362, 745-747.. <https://doi.org/10.1038/362745a0>
- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., Rolf, B., 1998. Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat. *The American Journal of Human Genetics* 62, 1408–1415.. doi:10.1086/301869
- Toth, G., 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research* 10, 967–981.. doi:10.1101/gr.10.7.967
- Kruglyak, S., Durrett, R.T., Schug, M.D., Aquadro, C.F., 1998, Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations, *Genetics* 95, 10774–10778..
- Harr, B., Zangerl, B., Schlötterer, C., 2000. Removal of Microsatellite Interruptions by DNA Replication Slippage: Phylogenetic Evidence from *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1001–1009.. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026381



- Dakin, E.E., Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509.. doi:10.1038/sj.hdy.6800545
- Ewens, W.J., 2016. Motoo Kimura and James Crow on the Infinitely Many Alleles Model. *Genetics* 202, 1243–1245.. doi:10.1534/genetics.116.188433
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M., 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591–1604.. doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01576.x
- Callen, D.F., Thompson A.D., Yang, S., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., Sutherland, G. R., 1993. Incidence and Origin of „Null“ Alleles in the (AC)<sub>n</sub> Microsatellite Markers. *Genetics* 52, 922–927..
- Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N., Pedersen, A.-M.K., 2000. Codon-Substitution Models for Heterogeneous Selection Pressure at Amino Acid Sites
- Savolainen, O., Pyhäjärvi, T., Knürr, T., 2007. Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38, 595–619..
- Fingerman, M., 1965. Chromatophores, doi:10.1152/physrev.1965.45.2.296
- Ford, E. B., 1945. Polymorphism, doi:10.1111/j.1469-185x.tb00315.x
- Kimura, M., Crow, J. F., 1964. The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population
- Chauhan, T., Short Tandem Repeats (STRs): A Secret of Every DNA Test. <https://geneticeducation.co.in/short-tandem-repeats-strs-a-secret-of-every-dna-test/>
- Sethuraman, A., 2018 Estimating Genetic Relatedness in Admixed Populations. *G3 (Bethesda)* 8(10): 3203–3220.. doi:10.1536/g3.118.200485
- Kopps AM, Kang J, Sherwin WB, Palsbøll PJ. How Well Do Molecular and Pedigree Relatedness Correspond, in Populations with Diverse Mating Systems, and Various Types and Quantities of Molecular and Demographic Data?. *G3 (Bethesda)*. 2015;5(9):1815-1826. Published 2015 Jun 30. doi:10.1534/g3.115.019323
- Edwards, A.W.F., 2008. G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg Equilibrium. *Genetics* 179, 1143–1150.. doi:10.1534/genetics.104.92940
- Hover, E.L., 1985. Differences in Aggressive Behavior between Two Throat Color Morphs in a Lizard, *Urosaurus ornatus*. *Copeia* 1985, 933.. doi:10.2307/1445244
- FLEGR, Jaroslav. *Evoluční biologie*. 2., oprav. a rozšíř. vyd. Praha: Academia, 2009. 569 s. ISBN 9788020017673.
- Obojživelníci - Amphibia / Red. Vlastimil Baruš, Ota Oliva. - 1.vyd. - Praha : Academia, 1992. - 338 s., 18 fotogr.: 59 obr.; 25 cm. - (Fauna ČSFR; Sv. 25) ISBN 80-200-0433-5

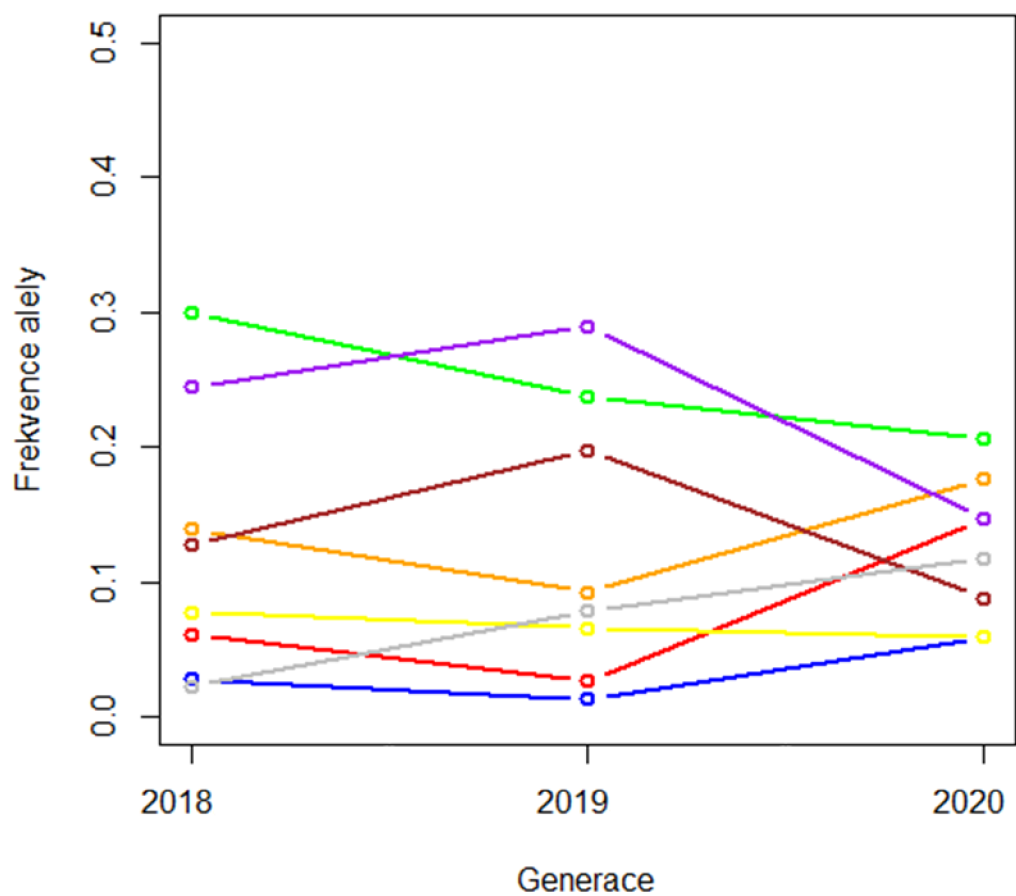
## 6 Přílohy

### Frekvence alel na lokusu 1



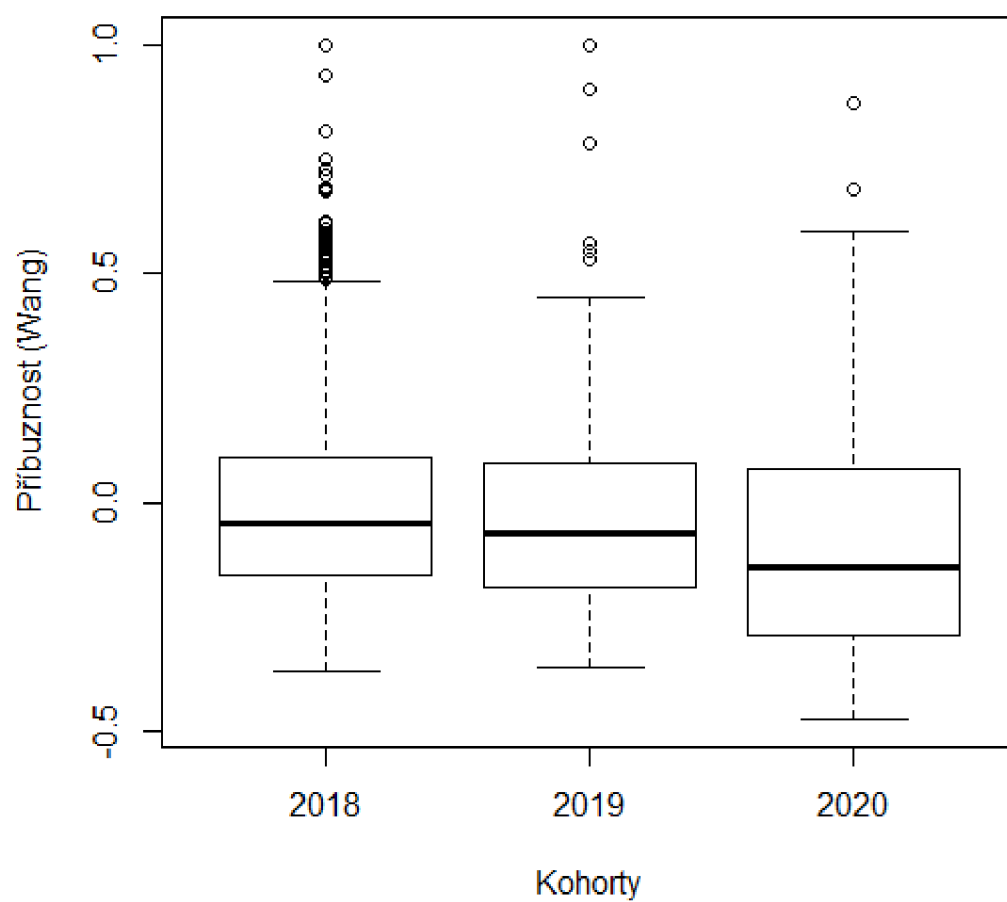
Obr. 3: Frekvence alel ještěrky obecné na lokusu LA01. Fialovou barvou je znázorněna alela s délkou 115bp, u které došlo k nejvýraznějšímu poklesu pozorované frekvence výskytu v kohortě.

## Frekvence alel na lokusu 5

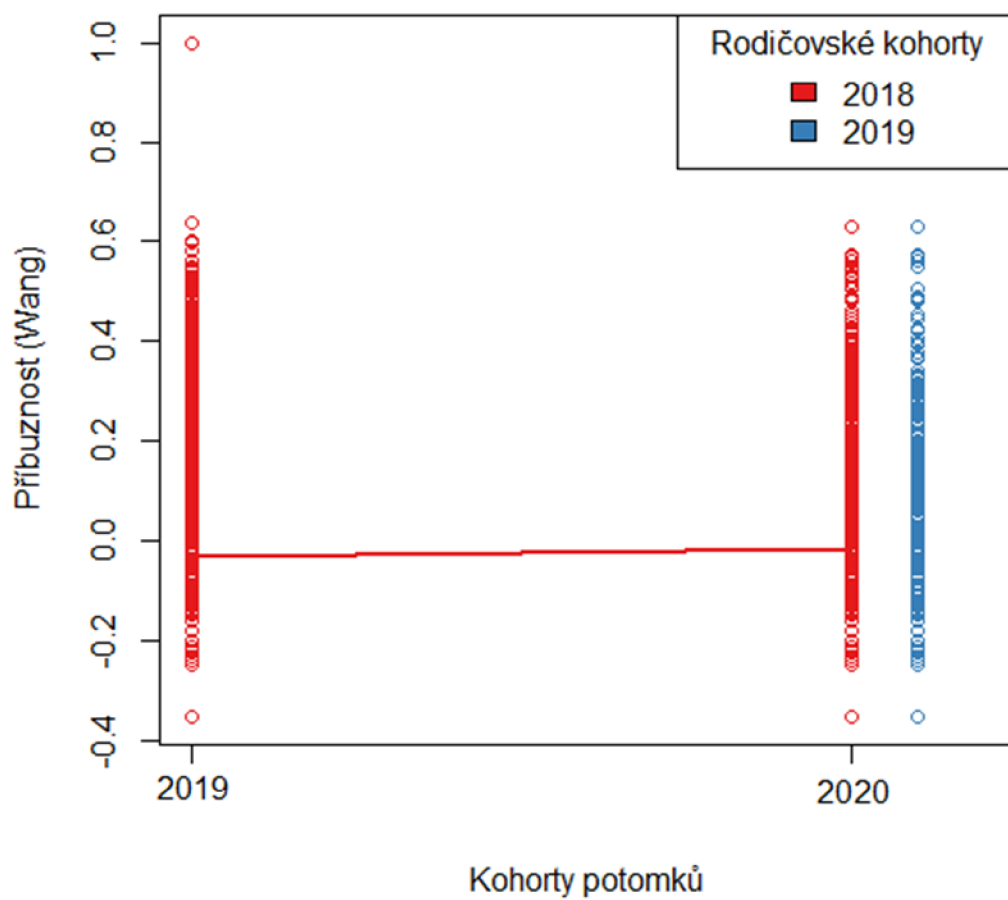


Obr. 4: Frekvence alel ještěrky obecné na lokusu LA55. U všech kohort nezamítáme platnost Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Tab. 2).

## Příbuznost jedinců v jednotlivých kohortách

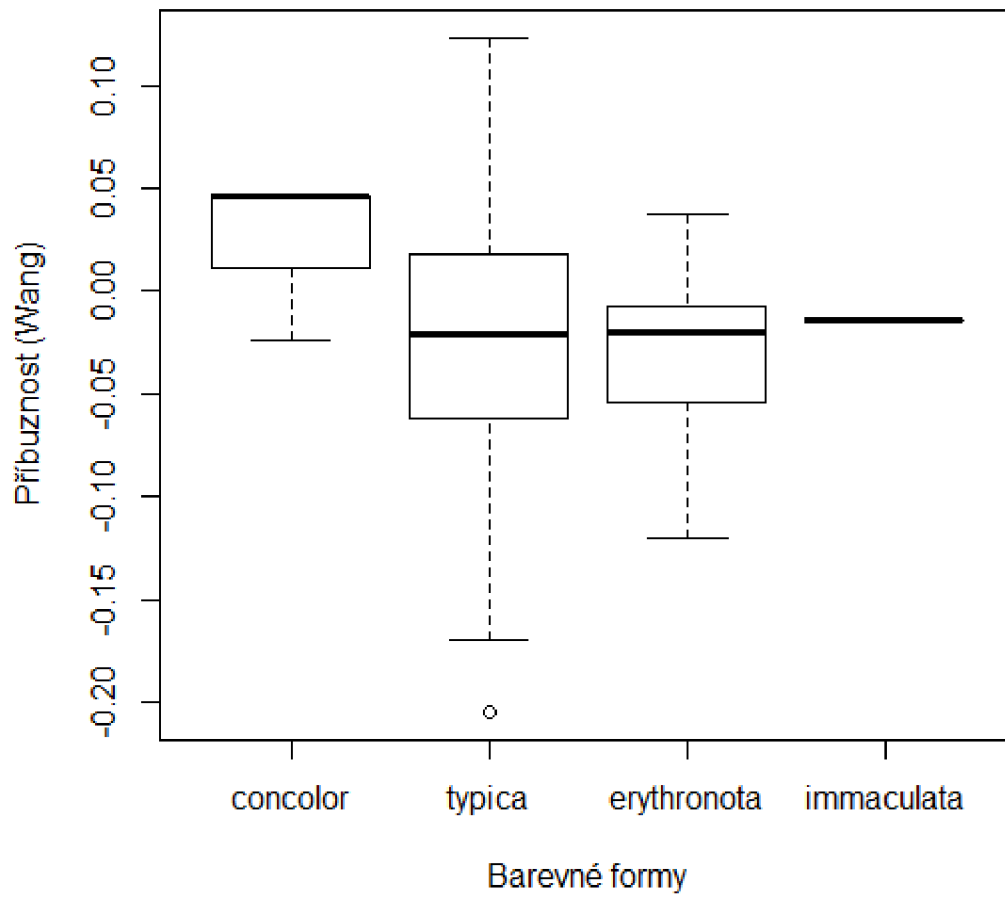


Obr. 5: Příbuznost všech jedinců ještěrky obecné z Hustopečí rozdělena do jednotlivých kohort.



Obr. 6: Příbuznost smíšených kohort ještěrky obecné na lokalitě v Hustopečích.

## Příbuznost jedinců podle barevných forem



Obr. 7: Příbuznost všech jedinců ještěrky obecné z Hustopečí rozdělená podle barevných forem.