



národní
úložiště
šedé
literatury

Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd česneku

Mitrová, Katarína; Ovesná, Jaroslava; Svobodová, Leona
2015

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-316558>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 24.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .

Katarína Mitrová, Jaroslava Ovesná, Leona Svobodová

Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd česneku



METODIKA PRO PRAXI



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015

Metodika byla vypracována pracovníky týmu Molekulární genetiky VÚRV, v.v.i. Vznikla za finanční podpory Mze ČR a je výstupem řešení projektu: MZE/QJ1210158 - Bezpečná a kvalitní zelenina r. *Allium* se zaměřením na česnek z domácích zdrojů (2012-2016, MZE/QJ) a výzkumného záměru MZE RO0415

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015

ISBN: 978-80-7427-195-3

Autoři: Ing. Katarína Mitrová

Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

RNDr. Leona Svobodová, Ph.D.

Název: Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd
česneku.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 20 ks

Vyšlo v roce: 2015

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: mitrova@vurv.cz

ovesna@vurv.cz

Autor fotografií: Ing. Pavel Svoboda

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015

ISBN: 978-80-7427-195-3

Katarína Mitrová, Jaroslava Ovesná, Leona Svobodová

**POUŽITÍ METODY ANALÝZY
MIKROSATELITŮ PRO
CHARAKTERIZACI ODRŮD ČESNEKU**

METODIKA PRO PRAXI

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2015

ISBN: 978-80-7427-195-3

Použití metody analýzy mikrosatelitů pro charakterizaci odrůd česneku.

Předmětem metodiky je postup charakterizace pravosti odrůd česneku pomocí analýzy mikrosatelitů (SSR- Single Sequence Repeats) laboratořemi v praxi. Tato metoda umožní identifikovat odrůdy česneku a charakterizovat genetické zdroje pomocí DNA markerů a určit jejich genetickou podobnost na základě délkové variability krátkých opakujících se sekvencí (mikrosatelitů) pro charakterizaci odrůd česneku *Allium sativum* L. Podstatou je amplifikace úseků genomu obsahující daný mikrosatelitní lokus pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery a následná analýza délky produktů a ztotožnění profilu DNA s deklarovanou odrůdou. Metodika nově přináší soubor SSR markerů, postup jejich hodnocení a interpretace výsledků.

The use of microsatellite analysis for the characterisation of garlic.

The object of the methodology is the process characterizing the authenticity of varieties of garlic put through microsatellite analysis (SSR- Single Sequence Repeats) for the characterization of varieties of garlic into the practice. This method allows to identify varieties of garlic and characterize genetic resources using DNA markers and determine their genetic similarity based on the length variability of short repeating sequences (microsatellites) in the characterization of varieties of garlic, *Allium sativum* L. The principle of the method is amplification of the genome containing the microsatellite locus by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and subsequent analysis of the length of the products and the identification of the DNA profile to the declared variety.

Oponenti: prof. Ing. Katerina Demnerová, CSc, VŠCHT Praha

MVDr. Kateřina Staňková, ÚKZÚZ Brno

Metodika byla schválena odborem výzkumu MZe pod č.j. 1/2016 ze dne 14.1.2016

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Obsah:

	strana
1. Úvod a cíl metodiky	3
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1 Podstata metody	4
2.2 Potřebné technické vybavení	5
2.3 Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat	7
2.4 Zhodnocení finanční, časové a kapacitní náročnosti	11
3. Přednosti metody a možnosti rutinního využití	12
4. Popis uplatnění metodiky	12
5. Použitá a další doporučená literatura	12

1. Úvod a cíl metodiky

Český česnek je v dnešní době žádanou komoditou a je snaha producentů zvýšit a zkvalitnit pěstování česneku na území České republiky. Často dochází k záměnám materiálů jak záměrnému, tak náhodnému a je třeba disponovat systémem, který v zájmu ochrany spotřebitele umožní jednoznačně identifikovat odrůdovou pravost. Metodika může být uplatněna i pěstiteli česneku (ověřování pravosti sadby) i při výběru nových šlechtitelských materiálů.

K ověřování pravosti lze obecně využívat morfologické markery, které jsou při prodeji komodity nepraktické a obtížně uplatnitelné, proteinové markery, které zatím nebyly zavedeny. Jednoznačně se uvádí, že nejpřesnější jsou postupy, které využívají profilování DNA. Jako vysoce přesné se uvádí analýza délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mirosatelitů (SSR) (Agarwal *et al.* 2008; Tomar *et al.* 2013; Hoshino *et al.* 2012).

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA nejčastěji o délce 2-6 párů bazí. Vyznačují se následujícími vlastnostmi (Vejl *et al.* 2002): vykazují vysoký stupeň polymorfismu, jsou relativně rovnoměrně zastoupené po celém genomu, jsou kodominantní. Běžně jsou pro mikrosatelity používány zkratky STRs (short tandem repeats; Edwards *et al.* 1991), SSR (simple sequence repeats; Tautz 1989; Morgante and Olivieri 1993). Členění a kategorie repetitivní DNA (Chambers *et al.* 2000): Satelity (Satellites), Minisatelity (Minisatellites), Mikrosatelity (Microsatellites). Mikrosatelity se nacházejí v celém genomu eukaryotických i prokaryotických organismů (Field and Wills 1998; Tóth *et al.* 2000), nejvíce pak v jeho nekódujících oblastech (telomery, subtelomery, heterochromatin u centromer) (Metzgar *et al.* 2000). Využití mikrosatelitů je velmi široké. Mikrosatelity se jeví jako hypervariabilní a kodominantní marker (Sunnuck 2000). Jako kodominantní markery relativně malé velikosti jsou jednoduše amplifikovány během PCR reakce. Výhodou je taky, že vyžadují minimální množství DNA a analýzy lze provádět v multiplexu, takže je i finančně únosná (de Vienne *et al.* 1998).

Cílem metodiky bylo nalézt soubor mikrosatelitních markerů použitelných pro jednoznačnou identifikaci vybraných odrůd česneku. Metodika vychází také ze znalosti, které již byly publikovány (Ovesná *et al.* 2014).

2. Vlastní popis metodiky

2.1 Podstata metody

- Izolace DNA česneku

Pro izolaci nukleových kyselin všeobecně je k dispozici škála metod, kde je prvním krokem lýza buněk. Pro lýzu rostlinných buněk česneku s buněčnou stěnou musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce.

U této izolace je nutné odstranit i polysacharidy extrakcí s cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB). K lyzátu je přidána směs chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Roztok je odstředěn a na rozhraní mezi fázemi se objeví bílý prstenec precipitovaných proteinů. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny.

Z vodného roztoku je DNA vysrážena přidáním koncentrovaného vymraženého etanolu. S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které je potřeba odmyt 75% etanolem. Čistá DNA česneku je po vysušení rozpuštěná ve vodě nebo v TA pufru. Pokud potřebujeme pracovat s čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy.

-Analýza mikrosatelitů

Délka alel se zjistí PCR amplifikací specifického lokusu pomocí primerů přiléhajících k mikrosatelitní sekvenci. Jeden primer z páru a to forward je fluorescenčně značen (6-FAM, VIC, NED, PET) specificky rozlišující odrůdy česneku. PCR fragmenty se pak rozdělí podle délky v sekvenátoru na principu kapilární elektroforézy v přístrojích ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Pro každou kombinaci mikrosatelitů a odrůdy je charakterizován specifický signál. Tak je možné jednoznačně odrůdu identifikovat. Ke každému vzorku se přidá fluorescenčně značený standard (500-LIZ).

2.2 Potřebné technické vybavení

0,2 ml sterilní zkumavky

1,5 a 2 ml sterilní zkumavky

6 x Loading Dye Solution

Analytická váha

Fotodokumentační zařízení

Elektromagnetické míchadlo

Eppendorf Thermomixer

Erlenmayerova baňka, 500 ml

Ethidium bromid

Hřebínek do elektroforetické vany a forma na gel pro elfo

Centrifuga s otáčkami min. 11000 otáček/min

Chladnička

Laboratorní parní sterilizátor

Magnetická míchačka

Mikropipety

Mikrovltná trouba

Mrazicí box (-20°C, -80°C)

Odměrný válec, 500 ml

Ochranné gumové rukavice bez pudru

PCR destičky vč. víček či folie

pH-metr

Skleněné háčky na zachycení DNA

Stolní minicentrifuga

Špičky na automatické pipety

Termocykler pro PCR _Eppendorf _ Mastercycler® nexusVortex

Zařízení na horizontální elektroforézu

Zdroj k elektroforézám

Spektrofotometr

Váženky

Vortex

Třecí misky a tloučky

Přístroj na kapilární elektroforézu ABI3130(Applied Biosystems) a program na vyhodnocení dat GeneMapper

Pro izolaci a amplifikaci DNA jsou potřebné následující roztoky a chemikálie:

- Agaróza
- tekutý dusík
- merkaptoethanol
- 2 X CTAB PUFRR:

2 M NaCl 40 ml	5 M roztoku
0,2 M Tris 20 ml	1 M roztok o pH 8,0
50 mM EDTA 10 ml	0,5 M roztok o pH 8,0
2 % CTAB	2 g
H ₂ O	do 100 ml

- TE PUFRR:

10 mM Tris 2,5 ml	1 M roztoku o pH 8,0
1 mM EDTA 0,5 ml	0,5 M roztok o pH 8,0
H ₂ O	do 250 ml

- směs chloroform: isoamylalkohol (24:1)
- 99 % roztok etanolu - vymražený
- 75 % roztok etanolu
- 1 x TAE PUFRR

TRIS báze (s) 4,8 g	0,48% roztoku
ledová CH ₃ COOH 1,5 ml	0,5M
EDTA (pH = 8,0) 2,0 ml	1mM roztok
H ₂ O	do1000ml

- Velikostní standard λ HindIII (Fermentas), vč. nanášecího pufrru

- PVP (Polyvinylpyrrolidon)
- RNáza A
- Syntetické oligonukleotidy - primery specifické pro daný druh rostliny (viz Tabulka 1)
- dNTP
- Tth polymeráza vč. pufru a MgCl₂ (Biotools)
- Ultra Pure H₂O pro PCR
- Formamid
- LIZ500 délkový standard

2.3 Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat

Izolace DNA

- Pro izolaci kvalitní DNA je možné použít jak listy tak i stroužky. U listů je vhodné použít mladé listy. Materiál je uchováván v PE zipových sáčkách nebo jsou listy zabaleny do alobalu a uchovávány při teplotě -80°C nebo je lze ihned zpracovat. Stroužky lze uchovat cca 1 měsíc na suchém chladném místě. Vzorky jsou doplněny popisem odrůdy a datem, příp. popisem lokality/místa odběru.
- Asi 0,5 mg rostlinného materiálu je rozetřeno tekutým dusíkem ve třecí misce, prášek je ihned přemístěn do 2ml mikrozkušavky se 700μl pufru 2xCTAB a 3 μl merkptoethanolu a promíchán pomocí vortexu. Poté jsou vzorky 30 minut inkubovány ve vodní lázni při teplotě 60°C (nebo v termomixéru). Pak je směs ochlazená 5 minut v ledu.
- Ke směsi je přidán 1x objem směsi chloroformu a izoamylalkoholu (24:1). Po 5 minutách třepání jsou vzorky centrifugovány při maximálních otáčkách po dobu 10 minut a je odebrána vodná fáze. Tento krok je ještě jednou zopakován.
- K roztoku vzorku je přidán 1x objem vymraženého 99 % etanolu. Vzorky jsou jemně promíchány několikanásobným převrácením zkumavky. Precipitovaná DNA je odebrána pomocí skleněných háčků. Vzorky na háčcích jsou umístěny do nových mikrozkušavek s 500μl 75% roztoku etanolu a inkubovány cca. 1 hodinu při teplotě 4°C.

- Po hodině jsou vzorky na háčcích znovu umístěny do nových 1,5 ml mikrozkušavek s 500 μ l 75% roztoku etanolu a inkubovány přes noc při teplotě 4°C.
- Druhý den je etanol odstraněn a vysušená DNA je rozpuštěna podle velikosti peletky ve 100 - 200 μ l TE pufru.
- K DNA je přidáno 20 μ l roztoku RNázy (20mg/ml) a vzorky jsou inkubovány 10 minut při 37°C.

Příprava 0,8% agarózového gelu a nanášení vzorků na gel

Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Pro objem 70ml 1xTAE je navážka agarózy 0,56 g a objem přidaného ethidium bromidu 0,7 μ l.

- na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy
- navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1 x TAE pufru a v mikrovlnné troubě se roztok přivede k varu
- baňka se postaví na elektromagnetickou míchačku a vloží se do ní míchadélko. Když teplota roztoku v baňce klesne na cca 60°C, přidá se k roztoku agarózy požadovaný objem ethidium bromidu a roztok se nechá ještě cca 1 minutu míchat
- tekutý roztok agarózy se nalije do formy na gel ve které je hřebínek a nechá se vychladnout
- po vychladnutí a ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků

Vzorky se na připravený gel nanášou podle následujícího pracovního postupu:

- z roztoku izolované DNA se odebere 1 μ l, k ní se přidá 7 μ l sterilní deionizované vody a 3 μ l 6 x Loading Dye Solution
- připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE puftrem
- do první a poslední dráhy se nanese 6 μ l délkového standardu DNA Ladder HIND III a do dalších drah se nanáší vždy 11 μ l každého vzorku
- elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut při 30 V

Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované DNA

- po ukončení elektroforézy se gel vizualizuje pomocí UV záření ve fotodokumentačním zařízení. Srovnáním pozice DNA s pozicí délkového standardu je pak určena délka produktu a stupeň jeho degradace.
- Koncentrace DNA vzorku je měřena spektrofotometrem. Optimální koncentrace pro další analýzy je 100 ng/μl. Vyšší koncentrace DNA se ředí TE pufrům. Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkoviny se získá změřením poměru absorpčních při vlnových délkách 260 a 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7-1,9.

Vzorky DNA jsou naředěny H₂O na pracovní koncentraci 100ng/μl.

SSR reakce:

Mastermix pro SSR reakci je namíchán z chemikálií, které jsou uvedeny níže. Celkově je připraveno množství, které odpovídá předpokládanému počtu analyzovaných vzorků. Při výpočtu příslušných objemů je potřeba počítat také s malou rezervou na ztráty při pipetování. Po smíchání všech složek mastermixu je tento rozpipetován v objemu 14 ml do tenkostěnných mikrokumavek a do každé z nich je posléze přidán 1 μl genomické DNA analyzované odrůdy (koncentrace 100 ng /ml).

Reakční směs:

směs primerů F+R (5mM)	1,0μl
dNTP (2,5 mM)	1,5μl
pufr (BioTools) (10x)	1,5μl
MgCl ₂ (15mM)	0,6μl
Tth polymeráza (BioTools) (5U/ul)	0,2μl
templátová DNA (100ng/ul)	1,0μl
H ₂ O	9,7μl
reakční objem	15,0μl

Mikrozkumavky jsou centrifugovány a umístěny do termocykleru Eppendorf_Mastercycler® nexus. PCR reakce sestává z následujících kroků:

1 cyklus: 95°C 5 min.

35 cyklů: 95°C 30 sec.

T_A^* 30 sec.

72°C 40 sec.

1 cyklus 72°C 5 min.

10°C ∞

Hodnoty T_A^* (annealing temperature) jsou pro jednotlivé mikrosatelitní markery uvedeny v Tabulce č.1.

Analýza PCR produktů kapilární elektroforézou

Při studiu mikrosatelitních oblastí genomu česneku je analyzováno celkem 16 lokusů (viz Tabulka č. 1). Produkty amplifikace jsou separovány elektroforeticky metodou kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Příprava vzorků pro fragmentační analýzu:

Formamid.....10,0 μ l

LIZ500 Size Standard 1 μ l

PCR vzorky: 6-FAM 0,4 μ l, VIC 0,4 μ l, NED 0,4 μ l, PET 0,4 μ l

-vzorky inkubujeme 7 minut při teplotě 94 °C a následně rychle zchladíme na teplotu 4°C.

Analýza PCR produktů v přístroji ABI PRISM 3130

Jako interní velikostní standard se používá LIZ 500 pro kombinaci primerů fluorescenčně značených 6-FAM, HEX, NED). Vzorky pro analýzu jsou připravovány do zkumavek, uzavřeny víčkem a centrifugovány.

Profily SSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného programu GeneMapper v 3.7. Výsledkem analýzy jsou velikosti jednotlivých fragmentů v bp a jejich zařazení do kategorií. Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají (DARwin, PCA).

Tabulka č.1: Analyzované SSR lokusy a sekvence primerů pro SSR analýzu česneku.

Název markeru	Forward primer	Reverse primer	Jednotka opakování	Velikost PCR produktu	*T _A °C
ASM035-6FAM**	6FAM-TTG GAC TGA ATT CTG AAT ACC T	GGG TGT GTG GTT CAA GGA	(GCC)3, (TCC)3	288-304	60
ASM040-VIC**	VIC-CAC AGC AAC ATG CAC CAT	TGC CGG AAC TCG ATA TT	(AC)6, (AC)14- (AT)5	268-300	60
ASM053-NED**	NED-ACA AGG TCG ACA TCG TTT G	GGG CTT CAC CTG AAC ACA	(CA)15, (AC)8	168-300	60
ASM059-PET**	PET-CTT GCC GGA ACT CGA TAT T	CAC AGC AAC ATG CAC CAT	(TG)11, (TG)5	280-476	60
ASM072-6FAM**	6FAM-CAC GCG AAT CTT TCT TGG	TGC AAA GCA ATA TGG CAG	(TA)7-(TG)5 GC (GT)9 T (TG)8	194-330	60
ASM078-VIC**	VIC-TGT TCC AAC CAG ATT TAA TGC	AAG TGG CGG TTG TGT CTG	(GT)12	194-234	60
ASM080-NED**	NED-AAT CTC CCT CCA AAG TCC C	CCT GTA TTT TGT GTA AAG CAT CA	(CCG)5	171-174	60
ASM109-PET**	PET-GGT CTC CTC ATC CAC CGT	GTG TGG GGC ATG ATT GAC	(ACC)4	212-245	60
INTRON_1 ^{CR1}	6FAM- AAGATCCAAGGTTGCTCTGC	CAGCAGCATTCCCCTACTACC		397-405	56
INTRON_2 ^{CR1}	HEX- ACTCGTCATCTCTTTTACC	TGTAATGAGGCCAGTAGTAAACC		481-489	60
ASA07-NED	NED-CTC GGA ACC AAC CAG CAT A	CCC AAA CAA GGT AGG TCA GC	(TG)7	229-235	60
ASA08-PET	PET-TGA TTG AAA CGA ATC CCA CA	GGG GGT TAC CTG AAC CTG TTA	(GT)8	209-257	60
ASA10-6FAM	6FAM-TTG TTG TTC TGC CAT TTT	GAT CTA AGC CGA GAG AAA	(AC)7	225-239	50
ASA14-VIC	VIC-TCT ATC TCG CTT CTC AGG GG	GCT GAC AGA AGT AGT CTT TCC	(GT)7	220-234	50
ASA16-NED	NED-CAC GAC TTT TCC TCC CAT TT	GCT AAT GTT CAT GTC CCC AGT	(TG)5 C (GT)6	148-154	60
ASA17-PET	PET-TCC ACG ACA CAC ACA CAC AC	ATG CAG AGA ATT TGG CAT CC	(CA)12 (CT)28	126-196	60

*T_A(annealing temperature), **reference Ma *et al.* (2009), ***reference Cunha *et al.* (2012),
^{CR1}reference VURV v.v.i.

2.4 Zhodnocení finanční, časové a kapacitní náročnosti

Analýza zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a následnou detekci velikosti produktů. Časově a pracovně náročná je extrakce DNA použitím CTAB metody, ale je levnější než extrakce použitím kitu. Zpracování 96 PCR vzorků (počet pozic v PCR destičce) všech 16 mikrosatelitních lokusů, což odpovídá 20 vzorkům česneku trvá cca 7-14 dnů. Výsledky elektroforetických analýz jedné destičky jsou k dispozici za 24 hod. Odborně náročnější část analýz představuje vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci a vyhodnocení alel programem GeneMapper 3.7 a následné porovnání se vzorníkem alel. To si vyžaduje zkušeného pracovníka. Cena analýzy jednoho vzorku česneku všemi markery činí 10.000,-Kč včetně izolace DNA a analýzy v přístroji ABI PRISM 3130. Ceny analýz závisejí na kurzu US dolaru a aktuálních cenách chemikálií a počtu analýz v jedné sérii.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Je třeba analyzovat alespoň 5 standardních vzorků (ze seznamu uvedených v Příloze I) a to v deseti nezávislých opakováních. Náklady na izolaci DNA 50 vzorků 5000 Kč, standard pro analýzu 20 000 Kč, náklady na pořízení SSR primerů 42 000 Kč, náklady na analýzu vzorku ve stroji 23 000 Kč a na ostatní materiál. Standardy, primery, analýza ve stroji jsou materiály, které se na verifikaci nezužítují všechny a mohou být použity v následných analýzách. Jejich množství závisí na nutnosti opakování některých analýz při zavádění metody. Náklady na zavedení metody bez započtení osobních nákladů, které se mohou lišit a lze je odhadnout na 100 000 Kč.

3. Přednosti metody a možnosti rutinního využití

Předností metody analýzy mikrosatelitů je, že je dobře aplikovatelná pro rutinní využití a má vysokou mírou reproducibility. SSR markery se ukázaly být přesné a vykazující stejné výsledky při jednotlivých opakováních experimentu, což potvrzují i některé publikace Jones *et al.* (1997), které sledovali reprodukovatelnost metod založených na DNA markerech. Díky zařazení standardů lze jednoznačně identifikovat jednotlivé alely daných lokusů. Analýza mikrosatelitů se používá rutinně ve forenzní diagnostice (Gilmore *et al.* 2003; Štambuk *et al.* 2007), ověřování původu zvířat (Marikar *et al.* 2014; Saberivand *et al.* 2011; Tupac-Yupanqui *et al.* 2010) a je doporučena i pro hodnocení odrůdové pravosti rostlin (Iqbal *et al.* 2010; Iquebal *et al.* 2013; McGregor *et al.* 2000).

Předložená metodika přináší validovaný postup upravený pro hodnocení odrůdové pravosti česneku a hodnocení genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů.

Je možné ji využívat v běžných laboratořích a to jak v akreditovaném systému tak pro výzkumné a vývojové účely.

4. Popis uplatnění metodiky

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů u odrůd česneku. Výstupem analýzy jsou pak amplifikované fragmenty DNA (spektrum markerů), které se použijí pro charakterizaci jednotlivých genotypů anebo určení odrůdové pravosti česneku.

Uživatelé metodiky mohou být orgány státní správy (ÚKZÚZ, SZPI), kontrolní a soukromé laboratoře v ČR.

Přílohou 1 je vzorník délky alel 10 základních odrůd česneku pěstovaných v ČR, které lze využívat jako standardy.

5. Použitá a další doporučená literatura

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

Cunha, C.P., Hoogerheide, E.S.S., Zucchi, M.M. and Pinheiro, J.B. (2012): New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* L. (Alliaceae). *American Journal of Botany*, 99: 17-19.

De Vienne D., Santoni S. (1998): Les principales sources de marqueur moléculaires. in: de Vienne et al.: Les marqueur moléculaire en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris, 1998: 15-47.

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49: 746-56.

Field, D. and Wills, C. (1998): Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 263:209-215.

Gilmore S., Peakall R., Robertson J. (2003): Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Science International*, 131: 65-74.

Hoshino A.A., Bravo J.P., Nobile P.M., Morelli K.A. (2012): Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis, *Genetic Diversity in Microorganisms*. InTech, book edited by Mahmut Caliskan, ISBN 978-953-51-0064-5.

Chambers, G. K., Macavoy E. S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry & Molecular Biology*. 2000, 126 (4): 455-476. [cit. 2012-09-15]. ISSN 1608-3202. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305049100002339>

- Iqbal A., Sadaqat H.A., Khan A.S., Amjad M. (2010): Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae) hybrids using simple-sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 10 (1): 102-106.
- Iqbal A., Sarika, Arora V., Verma N., Rai A., Kumar D. (2013): First whole genome based microsatellite DNA marker database of tomato for mapping and variety identification. *BMC Plant Biology*, 13: 197.
- Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmiroli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381–390.
- Ma K.H., Kwag J.G., Zhao W., Dixit A., Lee G.A., Kim H.H., Chung I.M., Kim N.S., Lee J.S., Ji J.J., Kim T.S., Park Y.J. (2009): Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). *Scientia Horticulturae*, 122: 355–361.
- Marikar F.M.M.T, Musthafa M.M. (2014): Usefulness of short sequence repeat markers in goat genetic diversity studies on the Asian and African continents. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 606-611.
- McGregor C.E., Greyling M.M., Warnich L. (2000): The use of Simple Sequence Repeats (SSRs) to identify commercially important potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 17, 4.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.
- Ovesná J., Leišová-Svobodová L., Kučera L. (2014): Microsatellite analysis indicates the specific genetic basis of Czech bolting garlic. *Czech Journal of Genetics and plant Breeding*, 50(3): 226-234.

- Saberivand A., Javanmard A., Safdari M., (2011): Parentage verification and identity test of Ghezel sheep using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(31): 5815-5819.
- Sunnuck P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.
- Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*, 4: 1193-1199.
- Tomar J.S., Soni K., Agrawal R., Saxena S., Saxena A.K. (2013): Microsatellite markers: A Breakthrough in evolutionary biology. *International Journal Of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 2(4): 385-409.
- Tóth, G., Gáspari, Z. Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Tupac-Yupanqui I., Martínez A., Méndez S., Delgado J.V., Gómez M., Dunner S., Cañón J. Schulz U., (2010): The Canarian Camel: A Traditional Dromedary Population. *Diversity*, 2: 561-571.
- Štambuk S., Sutlovič D., Bakarič P., Petričević S., Anđelinović Š. (2007): Forensic Botany: Potential Usefulness of Microsatellite-based Genotyping of Croatian Olive (*Olea europaea* L.) in Forensic Casework. *Croatian Medical Journal*, 48(4):556–562.

Příloha 1 : Vzorník alel odrůd česneku.

Jméno genotypu (odrůda)	A							B						
	ASM35		ASM40		ASM53		ASM59	ASM72		ASM78		ASM80		ASM109
	a	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a
Benátčan	290	257	283	207	215	295		219		209		157		209
Bjetin	288	275		201		287		221	237	197	207	153		205
Havran	290	275		213		287		243	259	203	207	157		205
Jovan	288	275		213		287		241	259	203	207	157		205
LAN	288	285		189	193	297		221	259	209		157		209
ZAH	282	257	281	207	215	293		221	277	209		153	157	209
Slavín	286	275		201		NA		221	259	209		157		203
Staník	282	257		203		269		261		207		157		205
Vekan	288	275	285	189	193	287	297	221	259	209		157		205

Jméno genotypu (odrůda)	C							F									
	Intron 1		Intron 3	ASA07		ASA08			ASA10			ASA14			ASA16	ASA17	
	a	b	a	a	b	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	a	b
Benátčan	401		489	235		263	269	293	230			225	231	237	185	135	167
Bjetin	397	405	485	237		265	287		230			227	233		185	141	
Havran	401		481	235	237	269	281	287	228			229			185	135	159
Jovan	401		481	235	237	269	281	287	228			229			185	135	159
LAN	403		481	237		265	287	305	230	232		227	233		185	141	159
ZAH	401		485	235		263	291		226	230	232	225	237	247	185	161	
Slavín	401		489	237		265	287	307	228			229			215	141	159
Staník	397	403	481	237	241	263	283	325	226	230		225	231		213	135	177
Vekan	403		481	237		265	279	287	228	230		227	233		185	141	159

a,b- délka SSR fragmentu; ACM – název SSR markeru, (A,B,C,F - pracovní označení multiplex sady primerů)