

*Rychlá metodika pro rozlišení česneku (*Allium sativum* L.), typu český paličák, pomocí mikrosatelitních markerů*

METODIKA PRO PRAXI



Jaroslava Ovesná, Katarína Mitrová, Ladislav Kučera
VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, V.V.I. | PRAHA 6 - RUŽYNĚ



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 RO0416

Autoři:

Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Ing. Katarína Mitrová

Ing. Ladislav Kučera, CSc.

Kontakt na autory: ovesna@vurv.cz
mitrova@vurv.cz
kuceral@vurv.cz

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 20 ks

Vyšlo v roce: 2017

Vydáno bez jazykové úpravy

Autor fotografií: Katarína Mitrová

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

ISBN: ISBN 978-80-7427-237-0

Rychlá metoda pro rozlišení česneku (*Allium sativum* L.), typu český paličák pomocí mikrosatelitních markerů

Předmětem metodiky je jednoduchý postup pro určení česneků typu český paličák pomocí analýzy mikrosatelitů (SSR- Single Sequence Repeats), který je využitelný zkušebními laboratořemi v praxi. Popsaná metoda umožňuje identifikovat odrůdy a novošlechtění českého česneku typu paličáku pomocí DNA markerů (alel mikrosatelitů), které jsou přítomny pouze u této skupiny odrůd a novošlechtění česneku. Podstatou je amplifikace úseků genomu obsahující daný mikrosatelitní lokus pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) při použití specifických, fluorescenčně značených primerů a následná analýza délky produktů PCR. Metodika nově přináší unikátní soubor diagnostických SSR markerů, postup hodnocení a interpretace výsledků.

A simple method for detection of Czech bolting garlicks (*Allium*

The object of submitted methodology is to simplify procedure that allow to determine Czech bolting garlic using microsatellite analysis (SSR- Single Sequence Repeats), which is applicable in testing laboratories. The described method allows to identify the variety and breeding material of bolting garlic of Czech origin using DNA markers (microsatellite alleles) that are present only for this group of varieties and breeding lines. By the amplification of the genome containing the microsatellite locus by polymerase chain reaction (PCR) using specific, fluorescently labeled primers, and subsequent analysis of the lengths of PCR products. Methodology newly brings a unique set of diagnostic SSR markers, describe the evaluation and interpretation of the results.

Oponenti: Doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, PhD.

Mgr. Lenka Bartošová, PhD., SZPI Brno

Metodika byla schválena odborem výzkumu MZe pod č.j. xxxxxx ze dne xxxxxx

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Obsah:

	strana
I. Úvod a cíl metodiky	4
II. Vlastní popis metodiky	5
a. Podstata metody	5
b. Potřebné technické vybavení	6
c. Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat	7
III. Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice	12
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	12
V. Ekonomické aspekty	12
VI. Seznam použité související literatury	13
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány	15
Přílohy	16

I. 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 polymorfismus DNA. Jako vysoce přesná se uvádí analýza délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mikrosatelitů (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 a 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 je pomocí fragmentační analýzy na bázi fluorescenční multiplex PCR, a při použití minimální sestavy mikrosatelitních markerů, umožnit jednoznačnou identifikaci vybraných skupin odrůd česneku, se zaměřením na odrůdy typu český paličák.

II. Vlastní popis metodiky

a. Podstata metody

Podstatou metodiky je fragmentační analýza délkového polymorfismu mikrosatelitních oblastí genomu česneku pomocí fluorescenční PCR při použití vhodných SSR markerů.

Izolace DNA česneku

Pro izolaci nukleových kyselin je všeobecně k dispozici škála metod, kde je prvním krokem rozrušení (lyze) buněk rostlinných pletiv. Pro rozrušení rostlinných buněk česneku s buněčnou stěnou musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení pletiva zmrazeného tekutým dusíkem v třecí misce. DNA lze izolovat z jakéhokoli pletiva rostliny česneku.

U izolace je nutné odstranit i polysacharidy extrakcí cetyl trimetyl amonium 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 ustálí bílý prstenec precipitovaných proteinů. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny.

Z vodného roztoku je DNA precipitována přidáním koncentrovaného vymraženého etanolu. S nukleovými kyselinami precipitují i soli, které je potřeba odmyt 75% etanolem. Purifikovaná DNA česneku je po vysušení rozpuštěná ve vodě nebo v TE pufru. Pokud potřebujeme pracovat s DNA bez RNA, ta se odstraní působením RNázy.

Analýza délky alel mikrosatelitů

Délka DNA sekvencí alel SSR lokusu se zjistí amplifikací sekvence lokusu pomocí PCR při použití primerů přiléhajících k mikrosatelitní sekvenci. Jeden primer z páru (forward) je značen určitým fluoroforem. Amplifikované sekvence (molekuly DNA) se pak rozdělí podle délky pomocí kapilární elektroforézy, například v přístroji ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Ke každému vzorku se přidává fluorescenčně značený standard (500-LIZ).

b. Potřebné technické vybavení

0,2 ml sterilní zkumavky	Mrazicí box (-20°C, -80°C)
1,5 a 2 ml sterilní zkumavky	Odměrný válec, 500 ml
6 x Loading Dye Solution	Ochranné gumové rukavice bez pudru
Analytická váha	PCR destičky vč. víček či folie
Fotodokumentační zařízení	pH-metr
Elektromagnetické míchadlo	Skleněné háčky na zachycení DNA
Eppendorf Thermomixer	Stolní minicentrifuga
Erlenmayerova baňka, 500 ml	Špičky na automatické pipety
Ethidium bromid	Termocykler pro PCR _Eppendorf _ Mastercycler® nexusVortex
Hřebínek do elektroforetické vany a forma na gel pro elfo	Zařízení na horizontální elektroforézu
Centrifuga s otáčkami min. 11000 otáček/min	Zdroj k elektroforézám
Chladnička	Spektrofotometr
Laboratorní parní sterilizátor	Váženky
Magnetická míchačka	Vortex
Mikropipety	Třecí misky a tloučky
Mikrovlnná trouba	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 PUFR:

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 PUFR:

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 PUFR

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	do 1000ml	

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

c. 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 mikrozkuřavky se 700 μ l pufru 2xCTAB a 3 μ l 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 mikrozkupek 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 mikrozkupek s 500μl 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 - 200μl TE pufru.
- K DNA je přidáno 20μl 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 0,7μl.

- 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 nanesou podle následujícího pracovního postupu:

- z roztoku izolované DNA se odebere 1 μl , k ní se přidá 7 μl sterilní deionizované vody a 3 μl 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 μl délkového standardu DNA Ladder HIND III a do dalších drah se nanáší vždy 11 μl 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 puftrem. Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se získá změřením poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm (A_{260}/A_{280}), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7-1,9.

Vzorky DNA jsou naředěny H_2O na pracovní koncentraci 100 ng/ μl .

PCR reakce:

Mastermix pro PCR reakci je namíchán z chemikálií, které jsou uvedeny níže. Celkově je připraveno množství, které odpovídá předpokládanému počtu analyzovaných vzorků plus jeden reakční objem navíc (rezerva na ztráty při pipetování). Po smíchání všech složek je mastermix rozpipetován podle použitého reakčního objemu (14,0 μl) do tenkostěnných mikrozskumavek a do každé z nich je posléze přidán 1 μl genomické DNA analyzovaného vzorku (koncentrace 100 ng / μl).

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
Výsledný 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.

Fragmentační analýza PCR produktů kapilární elektroforézou

Pro hodnocení vybraných mikrosatelitních oblastí genomu česneku jsou použity 3 SSR markery (viz Tabulka č. 1).

Příprava vzorků pro fragmentační analýzu:

Formamid 10,0 µl

LIZ500 Size Standard 1 µl

PCR vzorky: NED, 6FAM a PET po 0,4 µl

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

Jako interní velikostní standard se používá LIZ 500 pro kombinaci primerů fluorescenčně značených NED, 6FAM a PET. Vzorky pro analýzu jsou napipetovány do PCR destičky, uzavřeny víčkem a centrifugovány.

Produkty amplifikace jsou separovány elektroforeticky metodou kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) podle pokynů výrobce v uspořádání pro fragmentační analýzu.

Analýza PCR produktů v přístroji ABI PRISM 3130

Profily SSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného programu GeneMapper v 3.7. Výsledkem analýzy jsou velikosti jednotlivých produktů PCR v bp. Primární data se dále převádějí do tabulkové formy (například v programu EXCEL) pro porovnání s referenčními vzorky (nositeli jednotlivých alel hodnocených lokusů).

Tabulka č.1: Vybrané SSR markery a sekvence primerů pro SSR analýzu

Název markeru	Forward primer	Reverse primer	Jednotka opakování	Velikost PCR produktu	*T _A °C
ASA07-NED***	NED-CTT GGA ACC AAC CAG CAT A	CCC AAA CAA GGT AGG TCA GC	(GT)7	229-235	60
ASA72-6FAM**	6FAM-CAC GCG AAT CTT TCT TGG	TGC AAA GCA ATA TGG CAG	(TA)7-(TG)5GC(GT)9T(TG)8	194-330	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)

III. Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice

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 sledovaly 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 rychlý a validovaný postup upravený pro hodnocení pravosti česneku typu český paličák, hodnocení genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů.

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

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů u odrůd a genových zdrojů česneku a odlišit české odrůdy paličáků od ostatních odrůd, včetně odrůd paličáků zahraničního původu. Výstupem analýzy vybraných SSR lokusů je určení přítomnosti specifických alel, které jsou rozhodující pro určení, zda hodnocený vzorek česneku náleží do skupiny paličáků českého původu (vyšlechtěných v České republice z původních odrůd a klonů genových zdrojů, pocházejících z ČR, případně z oblasti pěstování na území bývalého Československa).

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

V. Ekonomické aspekty

Pracovní postup zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a následnou fragmentační analýzu produktů. Časově a pracovně náročná je extrakce DNA použitím CTAB metody, která je však levnější než extrakce použitím komerčních souprav. PCR pro jednotlivý SSR marker trvá cca 2 a půl hodiny. Primární výsledky elektroforetických fragmentačních analýz

při použití jedné destičky o 96 jamkách jsou k dispozici za 24 hod. Odborně náročnější částí je vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci produktů amplifikace programem GeneMapper 3.7 a následné porovnání velikostí amplifikovaných fragmentů s referenčními vzorky. Cena analýzy jednoho vzorku česneku všemi 3 vybranými SSR markery činí cca 4.000,- Kč (včetně izolace DNA, PCR a analýzy v přístroji ABI PRISM 3130). Ceny analýz jsou ovlivněny cenami chemikálií a počtem vzorků v jedné sérii. Tato cena je nižší než analýza vzorku česneku s použitím kompletní sady 16 markerů při potvrzování odrůdové deklarace (5.500,-Kč). Nižší je i časová náročnost zkoušky, vzhledem k menšímu počtu PCR reakcí a počtu panelů (použitých SSR markerů) při fragmentační analýze.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Je třeba analyzovat alespoň 5 standardních vzorků (referenčních standardů pro hodnocený SSR lokus) a to v deseti nezávislých opakováních (technické replikáty).

VI. Seznam použité související literatury

- 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 Wiele 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., Lejšová-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.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

- 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

Přílohy:

Příloha 1. Výsledky analýz českých a zahraničních odrůd česneku pomocí vybraných SSR markerů

ozimý/jarní	Růstový typ	Název odrůdy	SSR lokus	ASM72			ASA17		ASA07
				alela	alela	alela	alela	alela	
			Původ	ASM72_237	ASM72_259	ASM72_261	ASA17_159	ASA17_177	ASA07_237
ozimý	nepaličák	Jolimont	Fra	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Therador	Fra	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Germidour	Fra	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Thermidrome	Fra	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Arno	Fra	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Morado de Cuenca	Esp	0	0	0	0	0	0
jarní	nepaličák	Violet Spring Garlic	Esp	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Záhorský	Čsl	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Záhorský	Čsl	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Mojmír	Čsl	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Lukan	ČR	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Anton	ČR	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	Benátčan	ČR	0	0	0	0	0	0
jarní	nepaličák	Japo	ČR	0	0	0	0	0	0
jarní	nepaličák	Japo II	ČR	0	0	0	0	0	0
jarní	nepaličák	Matin	ČR	0	0	0	0	0	0
jarní	nepaličák	Lumír	ČR	0	0	0	0	0	0
ozimý	nepaličák	ZAHII	ČR	0	0	0	0	0	0
ozimý	paličák	Jovan	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Havran	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Blanin	ČR	0	0	1	0	1	1
ozimý	paličák	Mirka	ČR	0	0	1	0	1	1
ozimý	paličák	Staník	ČR	0	0	1	0	1	1
ozimý	paličák	Vekan	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Dukát	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Unikat	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Brick	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Karel IV.	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Tantal	ČR	0	0	1	0	1	1
ozimý	paličák	Tristan	ČR	0	0	1	0	1	1
ozimý	paličák	Slavín	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Džambul	ČR	0	0	0	1	0	1
ozimý	paličák	Bjetin	ČR	1	0	0	0	0	1
ozimý	paličák	Vinar	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Anin	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	BL127	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Al II	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	LAN	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	BL 183	ČR	0	0	1	0	1	1
ozimý	paličák	Rusák	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Rusák 4	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Rusák_Hradecký	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Rusák_Riegel	ČR	0	1	0	1	0	1
ozimý	paličák	Edenrose	Fra	0	0	0	0	0	0
ozimý	paličák	Goulurose	Fra	0	0	0	0	0	0
jarní	paličák	White Spring Garlic	Esp	0	0	0	0	0	0
jarní	paličák	Red American Garlic	Esp	0	0	0	0	0	0
ozimý	paličák	Harnaš	Esp	0	0	0	0	0	0
jarní	paličák	Spanish Roja	Esp	0	0	0	0	0	0
ozimý	paličák	White American Garlic	Esp	0	0	0	0	0	0

Příloha 2.: Sestava diagnostických markerů a alel specifických pro odrůdy česneku českého původu typu paličák

SSR marker		Diagnostika					Závěr
ASM72	alela	ASM72_237	nebo	ASM72_259	nebo	ASM72_261	Odrůda (klon) typu paličák, původ Česká republika
ASA17	alela	ASA17_159	nebo	ASA17_177			Odrůda (klon) typu paličák, původ Česká republika
ASA07	alela	ASA07_237					Odrůda (klon) typu paličák, původ Česká republika