

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Šárka Michálek Grygarová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mikrosatelity pro odlišení odrůd
rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*)**

Diplomová práce

Bc. Šárka Michálek Grygarová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Šárka GRYGAROVÁ
Osobní číslo: R220026
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Mikrosatelity pro odlišení odrůd rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*).
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce: biologie a variabilita druhu rakytník řešetlákový s důrazem na variabilitu genetickou, mikrosatelity známé u rakytníku řešetlákového.
3. PCR amplifikace DNA vybraných kultivarů rakytníku řešetlákového s využitím primerů pro polymorfni mikrosatelity vybrané v bakalářské práci Grygarová (2022).

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Wang, A., Zhang, Q., Wan, D., Yang, Y., Liu, J. (2008): Nine microsatellite DNA primers for *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae). *Conservation Genetics*, 9: 969–971.
2. Jain, A., Chaudhary, S., Sharma, P.C. (2014): Mining of microsatellites using next generation sequencing of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 115–123.
3. Li, H., Ruan, C., Ding, J., Li, J., Wang, L., Tian, X. (2020): Diversity in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) accessions with different origins based on morphological characteristics, oil traits, and microsatellite markers. *PLoS ONE* 15(3): e0230356.
4. Jain, A., Sharma, P.C. (2022): Morphometric and Microsatellite Diversity in Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Natural Populations Originating from the Different Geographical Regions of the Indian Himalayas. *Plant Molecular Biology Reporter*, 40: 566–578.
5. Chaudhary, S., Sharma, P.C. (2022): Genetic diversity and population structure in wild seabuckthorn (*Hippophae salicifolia* D. Don) growing in the Uttarakhand region of the Indian Himalayas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, DOI: 10.1007/s10722-022-01427-1.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 21. listopadu 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 23. listopadu 2022

Bibliografické identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Bc. Šárka Michálek Grygarová**Název práce:** Mikrosatelity pro odlišení odrůd rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*)**Typ práce:** Diplomová práce**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci**Vedoucí práce:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**Rok obhajoby práce:** 2024**Souhrn:**

Tato diplomová práce se zabývá hledáním vhodných mikrosatelitů, které by bylo možné použít pro odlišení odrůd rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*) pěstovaných na území České republiky.

Teoretická část se zprvu věnuje charakteristice rakytníku řešetlákového. Další kapitola je zaměřená na obecný popis populační genetiky a DNA markerů s obsáhlejší popisem populační genetiky u rakytníku řešetlákového a detailnější charakteristikou doposud všech známých mikrosatelitů u rakytníku řešetlákového. Poslední dvě kapitoly jsou zaměřené na určení pohlaví u rakytníku řešetlákového a na strukturu jeho genomu.

Experimentální část se zabývá analýzou a charakterizací 18 párů primerů, které poskytly polymorfni produkt v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022). Těchto 18 párů primerů bylo testováno na DNA 46 rostlin rakytníku řešetlákového, kdy se mělo jednat o 43 různých kultivarů a 3 rostliny bez kultivarového určení. Všech 18 lokusů bylo analyzováno a charakterizováno pomocí populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Celkově bylo detekováno 2 až 12 alel na lokus.

Klíčová slova: rakytník řešetlákový, *Hippophae rhamnoides*, mikrosatelity, kultivary**Počet stran:** 88**Počet příloh:** 1**Jazyk:** Český

Bibliographical identification:**Author's first name and surname:** Bc. Šárka Michálek Grygarová**Title:** Microsatellites for discriminating of cultivars of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)**Type of thesis:** Master thesis**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**The year of presentation:** 2024**Summary:**

This master thesis deals with the search for suitable microsatellites that could be used for the identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) cultivars grown in the Czech Republic.

The theoretical part is firstly devoted to the characteristics of sea buckthorn. The next chapter focuses on a general description of population genetics and DNA markers with a more comprehensive description of population genetics in sea buckthorn and a more detailed characterization of all microsatellites known so far in sea buckthorn. The last two chapters focus on sex determination in sea buckthorn and the structure of its genome.

The experimental part deals with the analysis and characterization of the 18 primer pairs that provided the polymorphic product in my bachelor thesis (Grygarová, 2022). These 18 primer pairs were tested on the DNA of 46 sea buckthorn plants, where 43 different cultivars and 3 plants without cultivar determination were to be tested. All 18 loci were analysed and characterized using the population genetic programs Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) and Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). In total, 2 to 12 alleles per locus were detected.

Keywords: sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, microsatellites, cultivars**Number of pages:** 88**Number of appendices:** 1**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 26. 4. 2024

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, čas, vstřícnost, trpělivost a veškerou pomoc při zpracování teoretické i experimentální části mé diplomové práce. Zvláštní poděkování patří mé rodině, kamarádům, a hlavně mému manželovi, za jejich neuvěřitelnou podporu během celého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Charakteristika rakytníku řešetlákového	3
3.2 Populační genetika a DNA markery	5
3.2.1 Populační genetika rakytníku řešetlákového	6
3.2.2 Mikrosatelity u rakytníku řešetlákového	9
3.3 Určení pohlaví u rakytníku řešetlákového	18
3.4 Struktura genomu rakytníku řešetlákového	20
4 Materiál a metody	23
4.1 Biologický materiál.....	23
4.2 Polymorfní mikrosatelitní lokusy u rakytníku řešetlákového	24
4.3 Seznam použitých chemikálií	25
4.4 Seznam použitých roztoků a jejich příprava.....	26
4.5 Seznam použitých laboratorních přístrojů	28
4.6 Izolace DNA	29
4.7 PCR amplifikace DNA rakytníku řešetlákového	30
4.8 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace	31
4.9 Statistické vyhodnocení výsledků.....	35
5 Výsledky.....	36
6 Diskuze.....	53
7 Závěr	62
8 Použitá literatura	63
9 Přílohy.....	75

Seznam obrázků

Obrázek 1: Plody rakytníku řešetlákového (foto: Zdeněk Chalupa).....	4
Obrázek 2: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace šestialelového mikrosatelitního lokusu SB 4.....	51
Obrázek 3: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace pětialelového mikrosatelitního lokusu SB 10.....	52
Obrázek 4: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace čtyřalelového mikrosatelitního lokusu SB 13.....	52

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Známé polymorfní mikrosatelity u rakytníku řešetlákového.....	15
Tabulka č. 2: Seznam 46 použitých kultivarů rakytníku řešetlákového včetně naměřené koncentrace vyizolované DNA.....	23
Tabulka č. 3: Seznam použitých 22 mikrosatelitních lokusů, které byly určeny jako polymorfní u rakytníku řešetlákového v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022).....	24
Tabulka č. 4: Složení PCR reakční směsi pro 46 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování).....	31
Tabulka č. 5: Teplotní a časový profil PCR reakce.....	31
Tabulka č. 6: Charakteristika 18 polymorfních a hodnotitelných lokusů, které byly testovány na 32 geneticky odlišných kultivarech rakytníku řešetlákového.....	38
Tabulka č. 7: 18 polymorfních a dobře hodnotitelných mikrosatelitních lokusů testovaných na 32 jedincích rakytníku řešetlákového.....	40
Tabulka č. 8: Genotypy u 46 kultivarů rakytníku řešetlákového pomocí 6 mikrosatelitů, které publikovali Jain <i>et al.</i> (2014) a Jain (2015).....	42
Tabulka č. 9: Genotypy u 46 kultivarů rakytníku řešetlákového pomocí 12 mikrosatelitů, které publikovali Li <i>et al.</i> (2020).....	44
Tabulka č. 10: Seznam mikrosatelitů a unikátních genotypů, které poskytly.....	49
Tabulka č. 11: Srovnání mých výsledků testovaných na 32 geneticky odlišných jedincích s výsledky Jain <i>et al.</i> (2014) testovaných na 18 jedincích.....	54
Tabulka č. 12: Srovnání mých výsledků testovaných na 32 geneticky odlišných jedincích s výsledky Jain (2015).....	55
Tabulka č. 13: Srovnání mých výsledků genetické diverzity pro 32 geneticky odlišných jedinců rakytníku řešetlákového s výsledky Jain (2015) za použití stejných 6 mikrosatelitů.....	56
Tabulka č. 14: Srovnání mých výsledků testovaných na 32 geneticky odlišných jedincích s výsledky Li <i>et al.</i> (2020) testovaných na 78 jedincích.....	58
Tabulka č. 15: Srovnání mých výsledků genetické diverzity pro 32 geneticky odlišných jedinců rakytníku řešetlákového s výsledky Li <i>et al.</i> (2020) pro 78 jedinců rakytníku řešetlákového rostoucích v severní Číně, za použití stejných 12 mikrosatelitů.....	59

1 Úvod

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*) je opadavý keř patřící do čeledi hlošínovitých (Elaeagnaceae) a pochází z chladných oblastí Asie a Evropy. Tato rostlina se hojně používá v potravinářském a kosmetickém průmyslu, v tradiční medicíně či pro ekologické účely. Rakytník řešetlákový mezi pěstiteli vzbuzuje značný zájem, jelikož jeho plody obsahují velké množství vitamínů, nutričních a bioaktivních látek.

V České republice se prodává přibližně 50 kultivarů rakytníku řešetlákového. Poptávka po rakytníku prudce roste, což může zapříčinit záměnu kultivarů u pěstitelů i prodejců. Navíc dalším problémem je, že semena rakytníku jsou často šířena pomocí ptáků. Proto je důležité, aby existovala sada mikrosatelitních markerů, která by jednoznačně identifikovala kultivar pomocí jeho genetického profilu. Pro některé druhy existují již tyto identifikační systémy či mezinárodní databáze, avšak pro rakytník řešetlákový zatím nebylo nic takového vytvořeno.

Tato práce se věnuje analýze a charakteristice 18 párů primerů, které poskytly polymorfni produkt v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022). Mikrosatelity byly testovány na 46 potencionálně geneticky odlišných kultivarech rakytníku řešetlákového, které jsou běžně komerčně dostupné v rámci České republiky.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce: biologie a variabilita druhu rakytník řešetlákový s důrazem na variabilitu genetickou, mikrosatelity známé u rakytníku řešetlákového.
3. PCR amplifikace DNA vybraných kultivarů rakytníku řešetlákového s využitím primerů pro polymorfní mikrosatelity vybrané v bakalářské práci autorky (Grygarová, 2022).

3 Literární přehled

3.1 Charakteristika rakytníku řešetlákového

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*) je odolná opadavá dřevina (Rousi, 1971). Rod rakytník je řazen do čeledi hlošinovité (Elaeagnaceae), do které patří další dva rody, a to hlošina (*Elaeagnus*) a šeferdie (*Shepherdia*) (Christenhusz *et* Byng, 2016). Druh rakytník řešetlákový byl podle Rousiho (1971) rozdělen do devíti poddruhů: *H. r. carpatica*, *H. r. caucasica*, *H. r. fluviatilis*, *H. r. gyantsensis*, *H. r. mongolica*, *H. r. rhamnoides*, *H. r. sinensis*, *H. r. turkestanica* a *H. r. yunnanensis*, z nichž nejrozšířenější a komerčně nejzajímavější jsou poddruhy *H. r. mongolica*, *H. r. rhamnoides* a *H. r. sinensis* (Kallio *et al.*, 2002). Avšak podle Liana (1988) má rakytník řešetlákový pouze osm poddruhů, jelikož poddruh *H. r. gyantsensis* označil jako samostatný druh *H. gyantsensis*.

Rakytník řešetlákový se přirozeně vyskytuje v chladných oblastech Asie a Evropy. V Evropě roste podél břehů řek a podél pobřeží Baltského moře ve Finsku, Polsku a Německu, dále podél Botnického zálivu ve Švédsku a v pobřežních oblastech Spojeného království, rozšířil se i do dalších zemí Evropy jako například do Dánska, Nizozemska, Francie, Švýcarska, Lotyšska, Litvy, Estonska atd. V Asii se přirozeně vyskytuje v chladných oblastech himálajských zemí: Indie, Nepál, Bhútán, severní část Pákistánu a Afghánistánu. Dále je rozšířen například v Číně, Mongolsku, Ruské federaci, Kazachstánu, Kyrgyzstánu, Uzbekistánu nebo v Turecku (Rousi, 1971; Biswas *et* Biswas, 1980; Kluczynski, 1989; Lu, 1992; Baker, 1996). Rakytník řešetlákový běžně roste na kopcích a svazích, v údolích a říčních nivách, podél pobřežních oblastí, v malých nebo velkých druhově uniformních houštinách nebo ve smíšených porostech s jinými druhy keřů a stromů (Li *et al.*, 2003).

Rakytník řešetlákový je trnitý keř nebo strom, který obvykle dorůstá výšky 2–4 metry. Má hnědou až černou hrubou kůru a hustou šedozelenou korunu (Bailey *et* Bailey, 1978; Li *et* Schroeder, 1996). Střídavé listy jsou 3–6 cm dlouhé, úzké a kopinaté a na svrchní straně jsou stříbrošedě zbarvené (Synge, 1974). Rakytník je dvoudomá rostlina a jeho květy jsou nenápadné a apetalní. K opylení dochází pouze pomocí větru, tudíž je důležité, aby samčí rostliny byly blízko těch samičích (Lu, 1992; Li *et* Schroeder, 1996; Li *et al.*, 2003).

Pro rakytník řešetlákový jsou typické jeho světle žluté až tmavě oranžové plody (viz Obrázek 1). Mají oválný až kulatý tvar a dozrávají od srpna až do září. Bývají

seskupeny v hustých trsech na větvích, kde jsou ostré trny (Lu, 1992; Li *et al.*, 2003; Valíček *et Havelka*, 2008).



Obrázek 1: Plody rakytníku řešetlákového (foto: Zdeněk Chalupa).

Plody rakytníku jsou významné pro své velice hojné množství obsahových látek. V plodech se nachází spousta vitamínů, cukrů, bílkovin nebo organických kyselin (Benanth *et Foldesi*, 1992). Nejvýznamnější látkou v plodech rakytníku je bezpochyby vitamín C neboli kyselina L-askorbová. Uvádí se, že plody rakytníku řešetlákového patří mezi nejbohatší rostlinné zdroje vitamínu C, jelikož mohou obsahovat až 2,5 g vitamínu C na 100 g plodů (Li *et Schroeder*, 1996; Li *et al.*, 2003; Gutzeit *et al.*, 2008). Dále se v plodech nacházejí vitamíny B1, B2, B3, B6, B9, E a K1 (Bajer, 2014). Další významnou látkou je kyselina jablečná, která způsobuje typickou kyselost plodů (Li *et al.*, 2003; Raffo *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2012). Rakytníková šťáva je lehce zakalená, což je způsobeno poměrně vysokým obsahem bílkovin v plodech (Beveridge *et al.*, 2002). V plodech rakytníku je mnoho minerálních látek, kdy mezi nejzastoupenější patří draslík, mangan a měď (Gutzeit *et al.*, 2008). Rakytník řešetlákový má také velké množství aminokyselin, z nichž nejdůležitější je kyselina asparagová (Yushipitsina *et al.*, 1988). Co se týče obsahu cukrů, tak plody rakytníku převážně obsahují glukózu, fruktózu a xylózu (Zheng *et al.*, 2012; Krejcarová *et al.*,

2015). Další klíčové sloučeniny jsou karotenoidy, které se podílejí na typické žluté až oranžové barvě plodů (Andersson *et al.*, 2009; Mendelová *et al.*, 2016).

Rakytník řešetlákový je pionýrský druh, a proto je často první dřevinou, která kolonizuje otevřené plochy jako jsou například pustiny, opuštěné zemědělské plochy anebo skalnaté ostrovy. Významný je rychle se šířící kořenový systém, který se využívá k regulaci půdní eroze. Stejně jako ostatní zástupci čeledi Elaeagnaceae má rakytník řešetlákový kořenové hlízky, na kterých se nacházejí symbiotické bakterie rodu *Frankia*. Pomocí této symbiózy jsou rostliny rakytníku schopné fixovat vzdušný dusík, což má značný ekologický význam (Gatner *et Gardener*, 1970; Lu, 1992).

Rakytník řešetlákový je považován za odolnou a suchovzdornou rostlinu, i přesto je to rostlina citlivá na nedostatek vlhkosti. Výsadba v suchých či polosuchých oblastech je možná, ale je potřeba zajistit přísun vody při výsadbě. Rakytník zvládne plodit až do nadmořské výšky 2000 m n. m. Tato rostlina dokáže odolávat teplotám od $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ až po $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eliseev *et Fefelov*, 1977; Kondrashov *et Sokolova*, 1990; Lu, 1992).

Co se týče využití, rakytník řešetlákový je považován za velmi všestrannou rostlinu. Pro ekologii je významný kvůli symbiotickým nitrogenním bakteriím na kořenech, pomocí kterých zvládne růst v nehostinných oblastech, dále se využívá pro rekultivaci půdy, k výsadbě větrolamů nebo například ke snižování znečištění ovzduší (Gatner *et Gardner*, 1970; Lu, 1992; Jasra, 1998; Small *et al.*, 2000; Singh *et Moersel*, 2005). Plody rakytníku se hojně využívají i v potravinářském průmyslu, a to například pro výrobu sirupů, džemů, džusů, čajů atd. (Lu, 1992; Tiitinen *et al.*, 2005). Díky svým léčivým účinkům se již od nepaměti používá i v lékařství. Mezi nejhlavnější farmakologické účinky patří mírnění zánětu, mírnění bolesti a podpora regenerace tkání. Dále je významná antioxidační aktivita, která může mít chemopreventivní a protinádorovou účinnost (Abartene *et Malakhovskis*, 1975; Kukenov *et al.*, 1982; Dai *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 1990; Buhatel *et al.*, 1991; Chen, 1991; Li *et Schroeder*, 1996; Rosch, 2004).

3.2 Populační genetik a DNA markery

Populační genetik je odvětvím genetiky, které poskytuje genetický základ evoluce, studuje genetické rozdíly mezi populacemi a také uvnitř populací a pomáhá pochopit variabilitu druhů v důsledku změn frekvencí alel ve zkoumané populaci na definovaném území (Falconer *et Mackay*, 1996; Gillespie, 1998). Informace

o genetické diverzitě jsou velmi užitečné při sběru a využívání rostlinného materiálu pro genové banky a šlechtění rostlin (Nybom, 2004).

Genetickou variabilitu u organismů je možno charakterizovat pomocí DNA markerů, což jsou krátké sekvence DNA, které lze snadno detekovat a jejich dědičnost je známá. Tyto markery mohou být založené na jaderné DNA, mitochondriální DNA (mtDNA) nebo v případě rostlin také chloroplastové DNA (cpDNA) a odhalují místa polymorfismu (tj. místa variability v sekvenci DNA), která jsou užitečná pro studium genetické diverzity (Winter *et al.*, 1995; Paterson, 1996; Joshi *et al.*, 1999; Collard *et al.*, 2005; Xu, 2010; Jiang, 2013). DNA markery mohou být identifikovány různými technikami. První technikou je hybridizace, která například umožňuje zjistit polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980). Jiné DNA markery jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Zde například patří náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990), inter simple sequence repeats (ISSR) (Godwin *et al.*, 1997), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), mikrosatelity nebo krátké tandemové repetice (SSR) (Tautz, 1989; Ramel, 1997; Tóth *et al.*, 2000). Poslední technikou je sekvenování DNA umožňující získání jednonukleotidových polymorfismů (SNP) (Gupta *et al.*, 2001; Wakeley *et al.*, 2001).

3.2.1 Populační genetika rakytníku řešetlákového

Rakytník řešetlákový je vytrvalá, planě rostoucí rostlina, dožívající se okolo 60 let. Je větrem opylovaný, raně sukcesní druh s šířením semen pomocí ptáků (Lu, 1992). Kvůli těmto vlastnostem se očekává relativně vysoká genetická variabilita uvnitř populací a nízká diferenciace mezi populacemi (Nybom, 2004).

První známou molekulární studií zabývající se genetickými vztahy u rakytníku provedli Yao *et al.* (1993). Použili izozymové markery pro analýzu genetické struktury u 2 druhů rakytníku (*H. neurocarpa* a *H. tibetana*) a 3 poddruhů *H. rhamnoides* (*H. r. rhamnoides*, *H. r. neurocarpa* a *H. r. turkestanica*). Zjistili, že největší genetická variace u rostlin rakytníku je v rámci populací a mezi poddruhy, zatímco mezi populacemi v rámci poddruhů je velmi nízká. I přestože se izozymové markery ukázaly jako velmi cenné v mnoha studiích rostlin, mají některé nevýhody, jako je nutnost okamžitého zmrazení nebo zpracování nasbíraného materiálu a omezený počet potencionálních lokusů. Proto se přešlo na studie založené na DNA (Bartish *et al.*, 1999).

Studii založenou na RAPD provedli Bartish *et al.* (1999). Předpokládali, že rakytník řešetlákový bude vykazovat vysokou genetickou diverzitu uvnitř populace a nízkou diferenciaci mezi populacemi, kvůli jeho způsobu rozmnožování a životní formě. Hlavním cílem jejich studie bylo prozkoumat potencionální význam ekologických a životních charakteristik pro genetickou variabilitu u rakytníku řešetlákového. Studii provedli na 10 populacích *H. r. rhamnoides* rostoucích v severní Evropě, z toho bylo 6 pevninských a 4 ostrovní. Pro srovnání zahrnuli i jeden vzorek *H. r. mongolica*. Jejich studie ukázala, že očekávaná heterozygotnost (H_E) byla v průměru 0,16. Očekávaná heterozygotnost je základním měřítkem genetické variace v populaci a popisuje podíl heterozygotních genotypů očekávaných v rámci Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Nei, 1993). Hodnota H_E , kterou Bartish *et al.* (1999) zjistili, je o něco nižší, než průměrná hodnota 0,22 uvedená v metastudii s 60 studiemi založenými na RAPD u různých rostlinných druhů (Nybom, 2004).

Sun *et al.* (2006) studovali pomocí RAPD 13 populací *H. r. sinensis* přirozeně rostoucích v Číně. Očekávaná heterozygotnost (H_E) v rámci populace byla 0,168, což je méně než u dřevin a většiny víceletých druhů rostlin, ale naopak více než u jednoletých nebo krátkověkých samosprašných druhů. Dále zjistili, že je nízká genetická variace mezi populacemi, za kterou nejspíš může šíření semen na velké vzdálenosti, které umožňují ptáci, a další charakteristické vlastnosti rakytníku, jako jsou například opylování větrem, široké zeměpisné rozšíření atd. Výsledky Sun *et al.* (2006) jsou dosti podobné výsledkům dříve uvedených u poddruhu *H. r. rhamnoides* (Bartish *et al.*, 1999).

Studie používající ISSR markery byla provedena na 11 populacích rakytníku řešetlákového rostoucího v severovýchodní a severozápadní Číně. Očekávaná heterozygotnost (H_E) v rámci populace odpovídala ostatním studiím a pohybovala se od 0,16 do 0,21, ale genetická diference byla pouze 7 %. Došli tedy k závěru, že geografická vzdálenost pravděpodobně nemá vliv na genetickou diferenciaci (Tian *et al.*, 2004a). Druhá studie s ISSR markery byla provedena na 15 přirozených populacích rakytníku řešetlákového rostoucích v Číně. Studie se zaměřila na 3 poddruhy rakytníku řešetlákového: *H. r. yunnanensis*, *H. r. sinensis* a *H. r. gyantsensis*. Průměrná očekávaná heterozygotnost (H_E) pro 7 populací *H. r. yunnanensis* byla 0,19, pro 7 populací *H. r. sinensis* byla 0,22 a pro jedinou populaci *H. r. gyantsensis* byla 0,14. Celková diference mezi všemi 15 populacemi byla 14,5 %. Avšak tato studie ukázala, že populace *H. r. gyantsensis* se výrazně lišila od ostatních populací, což

souhlasí s navrhovaným druhovým statusem *Hippophae gyantsensis*. Pomocí ISSR markerů nebyla nalezena žádná významná korelace mezi genetickými a geografickými vzdálenostmi populací (Tian *et al.*, 2004b).

Pro hodnocení genetické diverzity mezi *H. r. sinensis* a *H. r. yunnanensis* použili Wang *et al.* (2021a) 18 mikrosatelitů na 32 populacích rostoucích v Číně. Rovněž chtěli objasnit jejich geografickou hranici v nejednoznačných oblastech a odhadnout genetickou rozmanitost v rámci každého taxonu. Zjistili, že genová diverzita byla vyšší u *H. r. sinensis* než u *H. r. yunnanensis*. Dále se jim povedlo nalézt hybridizaci mezi *H. r. sinensis* a *H. r. yunnanensis* v několika populacích, které se nacházely v severní provincii Sečuán, a tedy se s největší pravděpodobností jedná o hybridní zónu těchto dvou poddruhů.

Genetickou a morfometrickou diverzitu u rakytníku řešetlákového založenou na mikrosatelitních markrech studovali Jain *et Sharma* (2022). Studii provedli na 93 jedincích *H. rhamnoides* z různých geografických lokalit reprezentujících 2 oblasti, a to Leh a Lahaul v indickém Himálaji. Všechny markery použité v této studii vykazovaly mezidruhovou přenositelnost na *H. salicifolia* a *H. tibetana*. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) pro jednotlivé lokusy se lišila od 0,00 do 0,73, s průměrem 0,24 na lokus, a očekávaná heterozygotnost (H_E) se pohybovala od 0,48 do 0,77, s průměrem 0,64 na lokus v populaci z Lehu. V případě populace z Lahaulu se pozorovaná heterozygotnost pro jednotlivé lokusy pohybovala od 0,00 do 0,60, s průměrem 0,29 na lokus, a očekávaná heterozygotnost byla v rozmezí od 0,49 do 0,78, s průměrem 0,65 na lokus. Zatímco očekávaná heterozygotnost se odhaduje z frekvencí alel, pozorovaná heterozygotnost se odhaduje přímo z jednotlivých genotypů a závisí na množství genetických variací v populaci i na úrovni inbreedingu, který zvyšuje homozygotnost (Ritland, 1996). Bylo tedy zjištěno, že očekávaná heterozygotnost překračuje pozorovanou heterozygotnost. Takto vysoká hodnota H_E bývá připisována deficitu heterozygotů, který mohl být způsoben faktory, jako je vyšší frekvence inbreedingu v populaci, malá populace, přítomnost nulových alel nebo kvůli Wahlundovu efektu, který má za následek deficit heterozygotů vyplývající ze struktury subpopulace (Xuan *et al.*, 2009).

V Indii, konkrétně ve státě Uttarákhend, byla provedena další studie, ale tentokrát na *Hippophae salicifolia*, kde byla potvrzena mezidruhová přenositelnost 15 mikrosatelitů, použitých v dřívějších studiích na *H. rhamnoides* (Chaudhary *et Sharma*, 2022; Jain *et Sharma*, 2022). V této studii Chaudhary *et Sharma* (2022)

odebrali vzorky listů ze 100 rostlin *H. salicifolia* rostoucích ve volné přírodě ze 17 různých lokalit pokrývajících 4 různé geografické oblasti (v této studii považované za 4 populace). Pozorovaná heterozygotnost pro jednotlivé lokusy se pohybovala od 0,00 do 0,61, s průměrem 0,36 na lokus. Očekávaná heterozygotnost se pohybovala od 0,48 do 0,77, s průměrem 0,64 na lokus. Posouzení genetické diverzity pomocí mikrosatelitních markerů v této studii bylo efektivní a velmi informativní.

Většina studií nezjistila souvislost mezi genetickou a geografickou vzdáleností rakytníku (Bartish *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2004b; Sun *et al.*, 2006). Zdá se, že variabilita uvnitř populace je vysoká zejména u druhů a poddruhů rakytníku, které se vyskytují blízko centra původu ve Střední Asii (Bartish *et al.*, 2000). Naopak malé a izolované populace (např. rostoucí ve vysokých nadmořských výškách) se často jeví jako homogennější (Zhao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).

3.2.2 Mikrosatelity u rakytníku řešetlákového

Kultivary rakytníku řešetlákového se navzájem značně liší například velikostí, barvou a tvarem plodů, ale často je obtížné je správně identifikovat pouze na základě morfologických znaků. Jednotlivé rostliny stejného kultivaru se mohou také navzájem lišit, pokud jsou pěstovány v různých podmínkách. Proto jsou zapotřebí metody pro jednoznačnou identifikaci kultivarů. V současné době toho lze dosáhnout použitím různých typů DNA markerů. Kultivary rakytníku řešetlákového se množí vegetativně, a proto se očekává, že budou tvořeny jediným genotypem, který lze identifikovat a odlišit od všech ostatních kultivarů.

Téměř každý typ molekulárních markerových metod, jako jsou RAPD, ISSR nebo AFLP, obvykle umožní rozlišit různé rostlinné vzorky (Ruan *et al.*, 2013). Pro vytváření mezinárodních databází se však zpravidla dává přednost SSR markerům a SNP datům, protože výsledky z různých laboratoří lze vzájemně porovnávat, pokud se používá stejná sada SSR primerů nebo stejné SNP matice. Takové databáze jsou v současné době u mnoha rostlin rozvíjeny ve stále větší míře a používají se jako základ pro definování profilů specifických pro jednotlivé odrůdy, jako jsou Malus UNiQue genotypy (MUNQ) založené na SNP u jabloní a Cherry UNiQue genotypy (CHUNQ) založené na SSR u třešní (Muranty *et al.*, 2020; Barreneche *et al.*, 2021). Pro rakytník

však dosud nebyla vytvořena žádná mezinárodní databáze, což ztěžuje vyhodnocování údajů z různých studií.

Mikrosatelity nebo též krátké tandemové repetice (SSR) patří mezi jedny z nejdůležitějších markerových systémů pro fylogenetické, rodičovské a populační studie rostlin, a to právě díky své vysoké vypovídající hodnotě, reprodukovatelnosti, vysoké úrovni polymorfismu, rozšíření relativně po celém genomu a také díky svému kodominantnímu způsobu dědičnosti (Ellegren, 2004; Kalia *et al.*, 2011; Hodel *et al.*, 2016; Nadeem *et al.*, 2017). Mikrosatelity jsou zpravidla nekódující repetitivní oblasti DNA, které jsou složeny z 1–6 bp dlouhých motivů tandemových repetic (Tautz, 1989). Délková variabilita mikrosatelitů bývá nejčastěji způsobená sklouznutím polymerázy na místech opakujících se nukleotidových motivů (Ellegren, 2004). Jak již bylo zmíněno, mikrosatelity mají vysokou úroveň polymorfismu, ta je dána výskytem různého počtu repetic v oblastech SSR a může být lehce detekována pomocí PCR (Zane *et al.*, 2002; Kalia *et al.*, 2011). Důležitým aspektem používání mikrosatelitů jako molekulárních markerů je to, že mikrosatelity jsou v genomu ohraničeny jedinečnými a konzervovanými sekvencemi DNA, které mohou být použity jako vzor při návrhu primerů a dále mohou být použity pro PCR amplifikaci cílového mikrosatelitního lokusu (Weber *et al.*, 1989). SSR lze rozdělit do dvou kategorií: genomické SSR (gSSR), které jsou rozmístěny napříč různými místy v genomu, a SSR s exprimovanými sekvencemi značkami (EST-SSR), které jsou vloženy do transkribovaných sekvencí (Li *et al.*, 2002; Guichoux *et al.*, 2011). Ve srovnání s gSSR mají EST-SSR nižší úroveň polymorfismu (Kalia *et al.*, 2011). Amplifikační účinnost EST-SSR je však mnohem vyšší než u gSSR, což může být způsobeno relativně vysoce konzervovanými transkribovanými oblastmi v sekvencích primerů (Wu *et al.*, 2014). EST-SSR také mají vyšší přenositelnost než gSSR u mnoha druhů (Wu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2019). Přestože mikrosatelity patří mezi užitečné markery, nebylo zatím vyvinuto mnoho mikrosatelitních markerů pro rakytník řešetlákový, případně pro další druhy rodu *Hippophae*.

Wang *et al.* (2008) byli první, kteří navrhli a publikovali SSR markery pro rakytník řešetlákový. Konkrétně charakterizovali 9 variabilních mikrosatelitních lokusů speciálně navržených pro *H. r. sinensis*. Celkem testovali 26 SSR na 12 jedincích *H. r. sinensis*, kdy 17 SSR bylo monomorfních a právě 9 lokusů bylo polymorfních. Počet alel na lokus se pohyboval od 3 do 12, očekávaná heterozygotnost od 0,27 do 0,48 a pozorovaná heterozygotnost od 0,14 do 0,30. Pro každý lokus byla

očekávaná heterozygotnost vždy větší než heterozygotnost pozorovaná. U žádného páru lokusů nebyla zjištěna významná genotypová nerovnováha. Dále provedli testy křížové příbuznosti u dalšího poddruhu a dalších tří příbuzných druhů. Pouze 8 lokusů bylo polymorfních u *H. r. turkestanica* a 7 u ostatních 3 druhů: *H. gyantsensis*, *H. neurocarpa* a *H. goniocarpa*.

Brzy následovala další práce zaměřená na mikrosatelity pro rakytník. Jain *et al.* (2010) navrhli 11 nových mikrosatelitů. Jedná se o první studii o mikrosatelitních markerech odvozených z EST u rakytníku. Ve srovnání s genomovými mikrosatelity se EST-SSR dají účinněji využít v experimentech molekulárního mapování a genového značení, protože je u nich větší pravděpodobnost, že budou vykazovat těsnou vazbu s důležitými znaky. Celkem navrhli 30 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů, které hodnotili na 14 jedincích rakytníku zahrnujících 5 jedinců *H. rhamnoides*, 5 jedinců *H. salicifolia* a 4 jedince *H. tibetana*. U *H. rhamnoides* bylo polymorfních 9 mikrosatelitů, u *H. salicifolia* bylo polymorfních 11 mikrosatelitů, avšak u jedinců *H. tibetana* nebyl zjištěn žádný polymorfismus. Počet alel získaných v této studii se pohyboval v rozmezí 2–4 alely u *H. rhamnoides* a *H. salicifolia*. Zajímavé je, že všechny lokusy byly monomorfní u *H. tibetana*. Možným důvodem těchto neobvyklých pozorování by mohla být skutečnost, že rostlinné vzorky byly sbírány v prostorách Defense Institute of High Altitude Research (DIHAR) v Indii a jedinci odebráni v případě *H. tibetana* nejspíše pocházejí z vegetativního množení, a tudíž by mohli představovat stejné genotypy. Mikrosateltní marker Hr06 vyvinutý dříve (Wang *et al.*, 2008) odhalil 12 alel na DNA 12 jedinců *H. r. sinensis* odebraných z navzájem vzdálených geografických lokalit. Naproti tomu stejný pár primerů odhalil ve studii Jain *et al.* (2010) pouze 2 alely, což lze vysvětlit tím, že biologický materiál jedinců z této studie byl sebrán na stejné lokalitě. Wang *et al.* (2008) zaznamenali úspěšnou *cross-species* amplifikaci Hr06 u *H. gyantsensis*, *H. neurocarpa* a *H. goniocarpa*. Jain *et al.* (2010) dále prokázali *cross-species* amplifikaci Hr06 u *H. salicifolia* a *H. tibetana*. Podobně Jain *et al.* (2010) prokázali *cross-species* amplifikaci všech 11 nových mikrosatelitních markerů u *H. salicifolia* a *H. tibetana*. Tyto dvě studie společně naznačují, že u rakytníku řešetlákového existuje značná genetická diverzita. Další druhy rakytníků (*H. salicifolia*, *H. tibetana*, *H. gyantsensis*, *H. neurocarpa* a *H. goniocarpa*) jsou si geneticky blízké, protože všechny mikrosatelitové markery specifické pro jednotlivé lokusy izolované z rakytníku řešetlákového se úspěšně křížově amplifikují u těchto druhů v očekávaném rozsahu velikostí.

Wang *et al.* (2011) studovali 12 čínských přirozených populací *H. r. sinensis* pocházejících ze 3 různých typů prostředí, a to ze severozápadní pouštní a travnaté oblasti, vysokohorské oblasti na Tibetské náhorní plošině a severovýchodní oblasti lesa s vlhkým podnebím. Wang *et al.* (2011) byli první, kteří ve své studii použili mikrosatelitní sekvence chloroplastů na rakytníku řešetlákovém. V této studii bylo vyvinuto 10 konzervovaných párů primerů pro dvouděložné krytosemenné rostliny (Weising *et Gardner*, 1999), 6 univerzálních párů primerů vyvinutých z *Arabidopsis thaliana* (Cheng *et al.*, 2006) a 3 páry primerů vyvinuté na základě chloroplastových genomů rostlin z čeledi lilkovité (Solanaceae) (Bryan *et al.*, 1999), které byly použity k detekci cpDNA mikrosatelitových lokusů. Z 19 testovaných chloroplastových mikrosatelitů bylo polymorfních 6 a detekováno bylo až 14 alel.

Srihari *et al.* (2013) byli další, kteří ve své práci použili mikrosatelity pro rakytník. Analyzovali genetickou diverzitu 48 jedinců rakytníku řešetlákového sesbíraných z 16 lokalit v severozápadní himálajské oblasti v Indii. Kromě SSR markerů ve své práci dále použili RAPD markery, ISSR markery a MADS-BOX primery. Použili 6 polymorfních mikrosatelitů z práce Wang *et al.* (2008), konkrétně se jednalo o mikrosatelity Hr01, Hr02, Hr03, Hr05, Hr06 a Hr07, pomocí kterých detekovali 2–4 alely. Dále použili i 2 páry primerů genu MADS-BOX (MADS BOX-2 a MADS BOX-5), pomocí kterých detekovali 5–8 alel. Avšak v této studii se více zaměřili na RAPD a ISSR markery, a tudíž v práci není dostatek informací o použitých mikrosatelitech.

Lācis *et Kota-Dombrowska* (2014) ve své studii rovněž použili mikrosatelity vyvinuté Wangem *et al.* (2008). Vybrali celkem 33 vzorků rakytníku řešetlákového, které představovaly různé mezidruhové křížence mezi *H. r. mongolica*, *H. r. rhamnoides* a *H. r. fluviatilis*, s cílem vytvořit reprezentativní soubor rakytníku řešetlákového rostoucího v Lotyšsku. Pro hodnocení genetické diverzity rakytníku řešetlákového bylo použito 8 dříve testovaných mikrosatelitních lokusů genomové DNA (Wang *et al.*, 2008), konkrétně se jednalo o mikrosatelity Hr01–Hr08. Dále použili 6 mikrosatelitů chloroplastové DNA (Wang *et al.*, 2011). Použitá sada genomických SSR markerů poskytla vysokou úroveň polymorfismu a bylo identifikováno od 4 (Hr08) do 21 (Hr04) alel na lokus. Zatímco 3 cpSSR lokusy byly monomorfní a další 3 byly polymorfní s počtem alel 2–3.

S novou sadou mikrosatelitů pro rakytník řešetlákový přišla práce Jain *et al.* (2014). Ve své studii se zaměřili na pochopení distribuce mikrosatelitů v transkriptomu

rakytníku a posouzení jejich funkčního významu při vývoji Unigene Specific Microsatellite Markers (USSM). K identifikaci a klasifikaci mikrosatelitů v předpokládaných monogenních vzorcích rakytníku řešetlákového byl použit nástroj pro vyhledávání mikrosatelitů MISA. Navržené SSR markery hodnotili na 18 jedincích *H. rhamnoides* sesbíraných z přirozené populace v Indii a na 5 jedincích *H. salicifolia* sesbíraných z areálu DIHAR v Indii. Celkem navrhli 25 párů primerů z nichž 11 poskytlo polymorfni produkt u všech jedinců *H. rhamnoides* a rovněž poskytlo polymorfni produkt u všech jedinců *H. salicifolia*. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 7.

Ve své disertační práci se Jain (2015) zaměřil na vývoj mikrosatelitních markerů pro hodnocení genetické diverzity u 93 jedinců rakytníku reprezentujících různé ekologické lokality ve dvou zeměpisných oblastech, Leh a Lahaul, v indickém Himálaji. Mikrosatelitní markery byly izolovány pomocí dvou přístupů. První přístup zahrnoval screening genomové knihovny obohacené o mikrosatelity, kdy v první fázi bylo sekvenováním 32 klonů z mikrosatelitové obohacené knihovny získáno 21 sekvencí obsahujících mikrosatelity a pro 15 z nich bylo možné navrhnout primery. Ve druhé fázi sekvenování 32 rekombinantních klonů vybraných na základě sekundárního screeningu poskytlo 30 sekvencí, které obsahovaly mikrosatelity. Ve druhém přístupu byla vytvořena databáze EST a sestava sekvencí celého transkriptomu prověřena na mikrosatelity pomocí vyhledávacího nástroje MISA. Screening těchto sekvenčních zdrojů poskytl obrovské množství monogenů pozitivních na mikrosatelity. Pro vybrané mikrosatelitní lokusy z těchto monogenů bylo navrženo 90 párů primerů. Dohromady bylo navrženo 135 mikrosatelitních markerů a použito na screening 93 jedinců rakytníku z oblastí Leh a Lahaul. Na sbírkách z Lehu bylo 32 mikrosatelitních markerů shledáno polymorfními, zatímco u sbírek z Lahaul bylo 30 mikrosatelitních markerů shledáno jako polymorfni. Dva markery, ESTSSR 12 a BT 7, byly ve sbírkách z Lahaul shledány jako monomorfni, což je pravděpodobně důsledek fixace alel v reakci na podmínky prostředí převládající v této oblasti. Jain (2015) detekoval celkem 2–8 alel.

Novou sadu mikrosatelitů pro rakytník řešetlákový popsali ve své práci Islam *et al.* (2015). Navrhli 26 nových mikrosatelitů a všechny byly úspěšně amplifikovány, avšak pouze 14 vykazovalo polymorfismus. Tuto sadu testovali na 24 jedincích *H. rhamnoides* rostoucích v různých lokalitách v Indii. Počet alel se pohyboval od 3 do 7.

První mikrosatelity speciálně navržené pro *H. tibetana* popisují Qiong *et al.* (2017). Pro mikrosatelitní analýzu odebrali celkem 241 jedinců *H. tibetana* ze 7 populací (4 populace z Nepálu a 3 populace z Tibetu). K charakterizaci genetické diverzity použili 8 mikrosatelitních lokusů. Počet detekovaných alel se pohyboval v rozmezí od 3 do 8.

Pro hodnocení genetických vztahů mezi 91 rostlinami rakytníku řešetlákového vyvinuli Li *et al.* (2017a) RNA-Seq SSR markery. Pro analýzu genetických vztahů bylo vybráno 91 jedinců z 31 kultivarů ze dvou poddruhů, *H. r. mongolica* a *H. r. sinensis*, pěstovaných v severní Číně. Jako potencionální molekulární markery bylo identifikováno celkem 7 540 RNA-Seq SSR. Pro validaci amplifikace bylo náhodně vybráno celkem 110 párů primerů. Celkem 17 lokusů SSR bylo identifikováno jako polymorfní u různých kultivarů rakytníku. Počet detekovaných alel se pohyboval od 2 do 5.

Transkriptomy *H. r. mongolica* kultivaru 'Xiangyang' byly analyzovány za účelem návrhu primerů a vyvinutí EST-SSR markerů. Li *et al.* (2017b) identifikovali 17 383 EST-SRR z nichž bylo navrženo 9 291 párů EST-SSR primerů. Náhodně vybrali 179 párů primerů, z nich se úspěšně amplifikovalo 142 párů primerů a celkem 40 párů primerů bylo polymorfních. Ale jen 17 párů primerů dále použili pro analýzu na 16 jedincích *H. r. mongolica* rostoucích v Číně. Počet alel se pohyboval od 2 do 6, pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,10 do 0,88 a očekávaná heterozygotnost se pohybovala od 0,18 do 0,75.

Genetickou rozmanitost rakytníku řešetlákového hodnotili Li *et al.* (2020) na 78 jedincích rostoucích v severní Číně, kdy 52 jedinců bylo *H. r. mongolica*, 6 jedinců bylo *H. r. sinensis* a 20 jedinců byli hybridní zmíněných dvou poddruhů. K posouzení genotypové diverzity použili 23 polymorfních SSR markerů, kdy identifikovali 2–5 alel na lokus. Pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,04 do 0,79 a očekávaná heterozygotnost se pohybovala od 0,04 do 0,68. Pomocí těchto markerů se jim povedlo rozlišit všech 78 jedinců a dále zjistili, že jedinci *H. r. mongolica* a *H. r. sinensis* byli geneticky vzdálení a hybridní přírůstky byli geneticky blíže ke *H. r. mongolica*.

Wang *et al.* (2021b) vyvinuli 36 nových mikrosatelitů pro rakytník řešetlákový a jedná se o poslední publikovanou práci s novou sadou SSR markerů pro rakytník řešetlákový. Analyzovali transkriptom a genom *H. r. mongolica*, konkrétně kultivaru 'Sluníčko'. Identifikovali 36 SSR markerů ze značek exprimovaných sekvencí (EST-

SSR) a sekvencí celého genomu (gSSR). Při použití stejného počtu lokusů vykazovaly EST-SSR vyšší přenositelnost na další druhy rakytníku než gSSR. Naproti tomu analýzy rodičovství ukázaly, že gSSR byly účinnější při určování rodičovství než EST-SSR v důsledku vyšší úrovně polymorfismu u gSSR. V této studii byly k hodnocení EST-SSR a gSSR použity 2 sady vzorků. První sada, která byla použita pro identifikaci polymorfismu, přenositelnost markerů a fylogenetickou rekonstrukci, zahrnovala 125 jedinců odebraných z přírodních populací, včetně 6 druhů rakytníků (*H. gyantsensis*, *H. salicifolia*, *H. tibetana*, *H. neurocarpa*, *H. litangensis* a *H. goniocarpa*) a 7 poddruhů rakytníku řešetlákového (*H. r. rhamnoides*, *H. r. turkestanica*, *H. r. caucasica*, *H. r. fluviatilis*, *H. r. mongolica*, *H. r. yunnanensis* a *H. r. sinensis*). Druhá sada, která byla použita pro analýzu rodičovství, zahrnovala 129 ručně opylovaných potomků kultivaru 'Sluníčko' (matka) a 2 jedince kultivaru 'Fengning' (otec, patří do *H. r. sinensis*) a 25 alternativních rodičů (7 samic *H. r. mongolica* a 18 samců *H. r. sinensis*). Analýza identifikovala 18 polymorfních EST-SSR a 18 polymorfních gSSR, které vykazovaly stabilní výsledky pro přenositelnost a fylogenetické analýzy. Počet alel u EST-SSR se pohyboval od 2 do 8, očekávaná heterozygotnost se pohybovala od 0,08 do 0,86 a pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,08 do 0,73. Počet alel u gSSR se pohyboval od 2 do 10, očekávaná heterozygotnost se pohybovala od 0,08 do 0,86 a pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,08 do 0,75.

Bez ohledu na použitý markerový systém odráží seskupení vzorků obecně taxonomické zařazení do různých poddruhů a také zeměpisný původ samotných vzorků nebo šlechtitelský program, v němž byly vyšlechtěny. Všechny známé a publikované mikrosatelity u rakytníku řešetlákového jsou shrnuty v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Známé polymorfní mikrosatelity u rakytníku řešetlákového.

Druh (poddruh)	Počet mikrosatelitů	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
<i>H. r. sinensis</i>	9	Hr01, Hr02, Hr03, Hr04, Hr05, Hr06, Hr07, Hr08, Hr09	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>H. rhamnoides</i>	11	HrMS003, HrMS004, HrMS010, HrMS012, HrMS014, HrMS018, HrMS021, HrMS023, HrMS025, HrMS026, HrMS028	Jain <i>et al.</i> , 2010

Tabulka č. 1: Pokračování 1.

Druh (poddruh)	Počet mikrosatelitů	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
<i>H. r. sinensis</i>	6	CCMP2, CCMP3, CCMP4, CCMP6, ARCP4, NTCP9	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>H. rhamnoides</i> , <i>H. salicifolia</i>	11	USSM 1, USSM 3, USSM 5, USSM 7, USSM 8, USSM 12, USSM 13, USSM 16, USSM 24, USSM 25, USSM 26	Jain <i>et al.</i> , 2014
<i>H. rhamnoides</i>	22	GLC 12, GLC 2-5, GLC 2-14, GLC 2-6, ESTSSR 3, ESTSSR 4, ESTSSR 10, ESTSSR 12, ESTSSR 14, ESTSSR 18, ESTSSR 23, ESTSSR 25, ESTSSR 26, USSM 30, USSM 31, USSM 34, USSM 50, USSM 66, BT 2, BT 7, BT 9, B 12	Jain, 2015
<i>H. rhamnoides</i>	14	LBSSR2107, LBSSR2108, LBSSR2110, LBSSR2117, LBSSR2121, LBSSR2153, LBSSR2161, LBSSR2172, LBSSR2183, LBSSR2201, LBSSR2211, LBSSR2213, LBSSR2214, LBSSR2215	Islam <i>et al.</i> , 2015
<i>H. tibetana</i>	8	HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HTP-18, HTP-21, HTP-26	Qiong <i>et al.</i> , 2017

Tabulka č. 1: Pokračování 2.

Druh (poddruh)	Počet mikrosatelitů	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
<i>H. r. mongolica</i> , <i>H. r. sinensis</i>	17	CL1076.Contig2_HR_301, Unigene28552_HR_2397, Unigene14574_HR_2027, CL2151.Contig4_HR_595, CL2197.Contig3_HR_618, CL2339.Contig9_HR_634, CL2394.Contig1_HR_655, CL2969.Contig3_HR_789, CL309.Contig1_HR_137, CL3347.Contig1_HR_902, CL338.Contig1_HR_138, CL3541.Contig1_HR_929, CL3558.Contig1_HR_936, CL3904.Contig3_HR_1006, CL4371.Contig1_HR_1073, CL4750.Contig2_HR_1131, CL4888.Contig1_HR_1143	Li <i>et al.</i> , 2017a
<i>H. r. mongolica</i>	17	Hs008, Hs032, Hs047, Hs097, Hs100, Hs111, Hs146, Hs149, Hs177, Hs192, Hs195, Hs227, Hs278, Hs282, Hs284, Hs296, Hs297	Li <i>et al.</i> , 2017b
<i>H. r. mongolica</i> , <i>H. r. sinensis</i> , hybridi (<i>H. r.</i> <i>mongolica</i> x <i>H. r.</i> <i>sinensis</i>)	23	SB 1, SB 2, SB 3, SB 4, SB 5, SB 6, SB 7, SB 8, SB 9, SB 10, SB 11, SB 12, SB 13, SB 14, SB 15, SB 16, SB 17, SB 18, SB 19, SB 20, SB 21, SB 22, SB 23	Li <i>et al.</i> , 2020

Tabulka č. 1: Pokračování 3.

Druh (poddruh)	Počet mikrosatelitů	Mikrosatelitní lokus	Literární zdroj
<i>H. r. mongolica</i>	36	eHs008, eHs032, eHs047, eHs097, eHs100, eHs111, eHs146, eHs149, eHs150, eHs177, eHs183, eHs192, eHs195, eHs203, eHs219, eHs227, eHs296, eHs297, gHs125, gHs126, gHs155, gHs161, gHs163, gHs238, gHs242, gHs247, gHs258, gHs259, gHs299, gHs300, gHs302, gHs304, gHs309, gHs310, gHs317, gHs321	Wang <i>et al.</i> , 2021b

3.3 Určení pohlaví u rakytníku řešetlákového

Rakytník řešetlákový se řadí mezi dvoudomé rostliny. Určení pohlaví u rakytníku řešetlákového je dáno geneticky systémem X/Y, přičemž samčí pohlaví je heterogametické (XY) a samičí pohlaví je homogametické (XX) (Westergaard, 1958; Shchapov, 1979; Ainsworth, 2000; Matsunaga *et* Kawano, 2001; Charlesworth, 2002; Liu *et al.*, 2004). V rámci ploch, kde je rakytník řešetlákový komerčně pěstován, je většina rostlin samičího pohlaví, samčí rostliny se zde nacházejí jen v takovém počtu, aby bylo zajištěno dostatečné opylení. Šlechtění rostlin je proto zaměřeno především na vývoj vysoce kvalitních samičích rostlin. Samčí sazenice se často vyřazují, jakmile lze zjistit jejich pohlaví, avšak určení pohlaví na základě morfologie nelze provést, dokud rostliny nevykvetou, což obvykle trvá 3–5 let. Metoda včasného rozlišení samčích a samičích sazenic by ušetřila mnoho času a místa ve šlechtitelských programech i v sazenicových plantážích (Nybom *et al.*, 2023).

Byly učiněny pokusy vyvinout DNA markery specifické pro pohlaví rakytníku řešetlákového, avšak ty obvykle nebyly dostatečně konzistentní, když byly testovány na rozmanitějších rostlinných materiálech. První studie byla založena na RAPD analýze potomstva pocházejícího z experimentálního křížení u *H. r. rhamnoides* (Persson

et Nybom, 1998). V této studii byl nalezen DNA marker specifický pro samčí pohlaví u potomků křížení 'Leikora' x 'Pollmix'. Tento marker byl schopen určit pohlaví pouze u potomků křížení 'Leikora' x 'Pollmix', u rostlin jiného rodičovského původu selhal. Zdá se, že tento DNA marker je spojen s oblastí určující pohlaví u kultivaru 'Pollmix', a proto by mohl být užitečný jako genetický marker pro pohlaví u potomků odvozených z kultivaru 'Pollmix' nebo případně z jiných příbuzných otcovských genotypů. Molekulární marker pro samčí pohlaví by však měl být v ideálním případě užitečný při všech vnitrodruhových kříženích. Bohužel, nalezený DNA marker při aplikaci na potomstvo získané z jiného křížení již nefungoval.

Další studie založená na RAPD analýze byla provedena u *H. rhamnoides* rostoucích v Indii. Sharma *et al.* (2010) ve své studii našli jeden marker specifický pro samčí pohlaví. Pokus byl dvakrát opakován se samčími i samičími vzorky DNA, aby se ověřila spolehlivost a stabilita markeru. Sharma *et al.* (2010) zjistili, že nalezený DNA marker je zcela vázán na samčí pohlaví a může být použit pro screening semenáčků za účelem určení pohlaví u *H. rhamnoides*.

Markery založené na RAPD jsou citlivé na jemné rozdíly v podmínkách PCR reakce, proto jim chybí 100% reprodukovatelnost, a tedy mají proměnlivou úspěšnost při určování identity či odlišnosti vzorku. Proto se upřednostňuje použití markerů sekvenčně charakterizované amplifikované oblasti (SCAR) před RAPD markery (Jang *et al.*, 2004). SCAR marker je fragment DNA amplifikovaný pomocí PCR s použitím specifických primerů o délce 18–26 bp, kdy tyto specifické primery jsou navrženy z nukleotidových sekvencí klonovaných z fragmentů RAPD (Yang *et al.*, 2014) nebo jiných fragmentů odvozených od markerů DNA, jako jsou ISSR (Yao *et al.*, 2019) nebo SSR (Baite *et al.*, 2020). V této souvislosti Korekar *et al.* (2012) poprvé vyvinuli 2 SCAR markery vázané na samčí pohlaví u rakytníku řešetlákového, které byly dále validovány v populaci složené ze 100 samčích a 120 samičích rostlin. Korekar *et al.* (2012) se domnívají, že jimi vyvinuté robustní SCAR markery by mohly umožnit včasné určení pohlaví u rakytníku řešetlákového. I přestože tyto markery byly ověřeny na velkém počtu jedinců, ti však pocházeli pouze z jedné populace, a proto by měly být tyto markery validovány na rostlinách zastupujících výrazně větší vnitrodruhovou variabilitu.

V posledních dvou desetiletích odhalily transkriptomické analýzy důležité informace o působení genů u mnoha rostlinných druhů. Tento přístup byl použit také u rakytníku řešetlákového při hledání genů specifických pro pohlaví. Chawla *et al.*

(2015) provedli studii s cílem identifikovat homologní geny rakytníku zapojené do vývoje květů, které mohou hrát roli při určování pohlaví. Ukázalo se, že 21 květních regulačních genů bylo rozdílně exprimováno napříč vývojovými stádii samčích a samičích květů ve vzorcích *H. rhamnoides*. Byly identifikovány 2 pravděpodobně slibné geny: *HrCRY2*, gen pro kryptochromový receptor, byl významně nadměrně exprimován u samičích květů, zatímco *HrCO*, gen pro cirkadiánní dráhu, byl významně nadměrně exprimován u samčích květů. Avšak k určení role těchto genů ve vývoji samčích a samičích květů je ještě zapotřebí další výzkum.

Další studie založená na SCAR markerech byla provedena u *H. rhamnoides* rostoucích ve východní provincii Čching-chaj v Číně (Zhou *et al.*, 2018). Celkem se testovalo na 140 samičích a 140 samčích rostlinách. Zhou *et al.* (2018) vytvořili SCAR marker specifický pro samičí pohlaví, který byl vyvinut z fragmentů RAPD markeru. Amplifikace markeru zcela jistě ukazuje na samičí pohlaví vzorku, zatímco žádná amplifikace neukazuje přímo na samčí pohlaví, protože může dojít například k selhání PCR, degradaci DNA apod. K vyřešení problému s určením samčího pohlaví by měl být podle autorů vyvinut SCAR marker specifický pro samčí pohlaví a v budoucnu použit v multiplexní PCR se SCAR markerem specifickým pro samičí pohlaví.

Mangla *et al.* (2019) provedli AFLP analýzu na 5 populacích *H. r. turkestanica*, která byla úspěšná a poskytla 4 specifické samičí a 2 specifické samčí fragmenty, které byly klonovány a sekvenovány a následně použity pro vývoj SCAR markerů. Nově vyvinuté SCAR markery byly následně testovány na 50 samčích a 50 samičích rostlinách. Většina testovaných markerů nebyla při použití na rozmanitější rostlinný materiál informativní, až na jednu výjimku: pár primerů pro lokus *HRML* (samčí lokus *H. rhamnoides*), který vytvořil fragment u všech samčích rostlin v testovaných 25 populacích. Tento fragment byl dále sekvenován a charakterizován a nyní je k dispozici jako oblast o velikosti 7 kb s názvem HRMSSR v databázi NCBI Genbank, Acc. No. KX444194.

3.4 Struktura genomu rakytníku řešetlákového

Rakytník řešetlákový je považován za všestrannou rostlinu, a proto je nesmírně důležité mít informace o genomu této rostliny. V posledních několika desetiletích přitahuje čím dál víc pozornosti různých vědců, avšak stále je málo studií a informací o jeho genomu. Cytogenetické analýzy byly donedávna zastoupeny pouze staršími

pracemi Shchapov (1979) a Rousi *et al.* (1980), kdy v obou pracích byl určen diploidní počet chromozomů $2n = 24$. Shchapov (1979) dále ve své studii odhalil, že rakytník řešetlákový má menší pohlavní chromozom Y a větší pohlavní chromozom X. Ghangal *et al.* (2013) ve své práci analyzovali transkriptom rakytníku, který poskytuje zdroj pro objevování genů a vývoj molekulárních markerů.

Puterova *et al.* (2017) se ve své studii zaměřili na analýzu transponovatelných elementů a satelitů genomu rakytníku řešetlákového a určili chromozomální lokalizaci těchto repetitiv. Pro analýzu dat vyvinuli nový bioinformatický přístup pro pokročilou analýzu satelitní DNA a zjistili, že přibližně 25 % genomu tvoří satelitní DNA a přibližně 24 % je tvořeno transpozony, kterým dominovali Ty3/*Gypsy* a Ty1/*Copia* LTR retrotranspozony. Dále provedli mapování pomocí FISH, které odhalilo satelity akumulované na pohlavních chromozomech X i satelity specifické pro pohlavní chromozom Y nebo akumulované na obou pohlavních chromozomech, ale většina satelitů se nacházela na autozomech. Transpozony se nacházely převážně v subtelomerických oblastech všech chromozomů. Také potvrdili, že rakytník řešetlákový má velký chromozom X a malý chromozom Y. Přestože prokázali malou velikost chromozomu Y a nahromaděnou satelitní DNA v něm, nebyli schopni odhadnout stáří a rozsah degenerace chromozomu Y.

Wu *et al.* (2022) ve své práci jako první uvádějí velikost genomu rakytníku řešetlákového. Kombinací technologií sekvenování s krátkým čtením, dlouhým čtením a Hi-C vytvořili referenční genom *H. rhamnoides* na úrovni chromozomů o velikosti 730 Mb. Na základě genomických a transkriptomických dat předpověděli 30 812 genů kódujících proteiny v genomu *H. rhamnoides*. Analýzou genomu dále předpověděli 1 508 309 repetitiv o celkové délce 346,8 Mb, což představuje 47,48 % genomu rakytníku řešetlákového. Většina repetitiv byla zastoupená transpozibilními elementy, mezi nimiž nejvyšší podíl představovaly LTR retrotranspozony, a to konkrétně nadrodiny *Gypsy* a *Copia*. Tyto LTR retrotranspozony podrobili další sekvenční analýze a zjistili, že naprostá většina LTR retrotranspozonů rakytníku řešetlákového vznikla nedávnou explozivní expanzí.

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) usnadňuje přesnou identifikaci chromozomů a umožňuje srovnávací cytogenetickou analýzu. Detekce autozomálních chromozomů rakytníku řešetlákového nebyla dosud provedena. Luo *et al.* (2022) ve své práci pomocí metody FISH detekovali chromozomy 5 taxonů *H. rhamnoides*: 3 čínské kultivary *H. rhamnoides* ('Shenqihong', 'Zhuangyuanhuang' a 'Wucifeng'), 1 kulturní

H. r. sinensis a 1 planě rostoucí *H. r. sinensis*. Celkem v mitotické metafázi jasně pozorovali 24 chromozomů. Tyto chromozomy byly malé o velikosti 0,89–3,03 μm a většina z nich vykazovala podobnou morfologii. Vzhledem k malé velikosti chromozomů a nejednoznačnému určení polohy centromery v této studii měřili pouze celkovou velikost chromozomů. Délku dlouhého/krátkého raménka, karyotyp a cytotyp, které se běžně hodnotí při analýze karyotypu, nebylo možné v této studii stanovit. V této práci se nepodařilo rozlišit pohlavní chromozomy a autozomy, nicméně podle předchozích analýz rozložení chromozomů je chromozom X jedním ze 3 nejdelších chromozomů a chromozom Y je jedním z 5 nejkratších chromozomů (Shchapov, 1979; Puterova *et al.*, 2017). Luo *et al.* (2022) provedli studii za účelem identifikace chromozomů *H. rhamnoides* a porovnání šlechtěných a přírodních *H. r. sinensis* se 3 čínskými odrůdami *H. rhamnoides*. Informace o identifikaci chromozomů, stejně jako identifikace taxonů, by podle nich měla pomoci šlechtitelům při využívání přírodních zdrojů *H. rhamnoides*.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V rámci praktické části této diplomové práce byl použit biologický materiál pocházející ze 46 rostlin rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*). Konkrétně se mělo jednat o 43 různých kultivarů rakytníku řešetlákového a 3 rostliny bez kultivarového určení, jejich pohlaví mělo být: 6 samců ('Pollmix', 'Tarmo', SAD (samec), 'Romeo', 'Otto' a 'K+'), 2 oboupohlavní rostliny ('Friesdorfer Orange' a 'Sandora') a 39 samic. Z těchto rostlin byly odebrány listy a dále byly skladovány v mrazničce při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dokud neproběhla izolace DNA. Z odebraných vzorků rostlinného materiálu byla vyizolovaná genomická DNA a následně byla rozpuštěna v TE pufru. Poté byla změřena její koncentrace pomocí spektrofotometru NanoDrop a dále byla naředěna tak, aby se koncentrace pohybovala v rozmezí $5\text{--}10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Seznam 46 rostlinných vzorků je uveden v Tabulce č. 2 pod názvy kultivarů, jež uváděli prodejci. V případě 3 neznámých vzorků je použito označení SAD se slovním dovětkem pro odlišení. Zároveň v Tabulce č. 2 je uvedena naměřená koncentrace vyizolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.

Tabulka č. 2: Seznam 46 použitých kultivarů rakytníku řešetlákového včetně naměřené koncentrace vyizolované DNA.

Kultivar	Koncentrace DNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	Kultivar	Koncentrace DNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
'Pollmix'	159,1	'K+'	188,3
'Frugana'	197,2	'Krasavice'	53,7
'Tarmo'	60,0	'Kapriz'	46,6
'Altajská'	86,9	'Rosinka'	170,3
'Podruga'	89,9	'Žemčužina'	158,8
'Botanika'	23,1	'Perčík'	105,0
'Habego'	399,6	'Parád'	49,3
'Ananasná'	73,9	'Sudaruška'	175,4
'Sluníčko'	71,0	'Friesdorfer Orange'	165,3
'Nela'	114,7	'Voroběvská'	80,5
SAD (samec)	107,1	'Bohatýr'	206,5

Tabulka č. 2: Pokračování.

Kultivar	Koncentrace DNA [ng·μl⁻¹]	Kultivar	Koncentrace DNA [ng·μl⁻¹]
'Lotta'	198,2	'Elizaveta'	205,5
'Sirola'	206,1	'Tenga'	151,0
'Aromat'	102,1	'Červená Pochodeň'	237,0
'Leikora'	179,8	'Dorana'	322,1
SAD sever (samice)	275,4	'Čujská'	325,0
'Tytti'	75,6	'Askola'	378,1
'Hergo'	209,6	'Sandora'	394,0
'Julia'	48,3	'Inja'	162,5
'Baltik'	23,8	'Eva'	169,0
'Romeo'	161,6	'Pantělejevská'	167,0
'Moskevská Krasavice'	57,8	'Ljubimaja'	113,0
'Otto'	141,4	SAD jih (samice)	400,0

4.2 Polymorfní mikrosatelitní lokusy u rakytníku řešetlákového

Pro odlišení odrůd rakytníku řešetlákového byly použity páry primerů, jenž byly určeny jako polymorfní v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022) pomocí PCR amplifikace na DNA 6 různých kultivarů rakytníku řešetlákového. V mé bakalářské práci bylo celkem určeno 36 mikrosatelitů, které poskytly polymorfní a hodnotitelný PCR produkt. Z těchto 36 mikrosatelitních lokusů bylo pro další testování v této diplomové práci vybráno 22 mikrosatelitních lokusů, které jsou uvedeny v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Seznam použitých 22 mikrosatelitních lokusů, které byly určeny jako polymorfní u rakytníku řešetlákového v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022).

Mikrosatelit	Literární zdroj
USSM 1, USSM 3, USSM 5, USSM 7, USSM 13, USSM 16, USSM 25	Jain <i>et al.</i> , 2014
USSM 30, USSM 50	Jain, 2015
SB 2, SB 3, SB 4, SB 7, SB 8, SB 9, SB 10, SB 11, SB 13, SB 14, SB 18, SB 20, SB 22	Li <i>et al.</i> , 2020

4.3 Seznam použitých chemikálií

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) (Roth)
- Deionizovaná voda
- dNTPs ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1000 \mu\text{l}$ každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Chloroform (Lachner)
- Isoamylalkohol (IAA) (Lachner)
- Isopropylalkohol (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Močovina (Lachner)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)
- N,N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP 40) (Fluka)
- Rain off - tekuté stěrače (Sheron)
- Tekutý dusík (Linde)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Triton X-100 (AppliChem)

- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)
- β -merkapt ethanol (Serva)

4.4 Seznam použitých roztoků a jejich příprava

Akrylamid, 6% zásobní roztok:

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu:N,N'-methylbisakrylamidu 19:1
- všechny složky rozpustit, zfiltrvat a uložit do chladničky v tmavé láhvi

Akrylamid:N,N'-methylenbisakrylamid 19:1, 40% zásobní roztok:

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'-methylenbisakrylamidu
- rozpustit v 500 ml deionizované vody
- objem doplnit do 1000 ml
- roztok uložit v temné láhvi ve 4 °C

CTAB extrakční pufr:

- 5 g CTAB
- 25 ml Tris o koncentraci 1 mol·l⁻¹, pH 8,0
- 10 ml Na₂EDTA o koncentraci 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0
- 20,45 g NaCl
- 2,5 g PVP 40
- objem doplnit do 250 ml deionizovanou vodou

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

- 0,8 g AgNO₃
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Fix/stop roztok:

- 80 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

Hydroxid sodný o koncentraci 1 mol·l⁻¹:

- 40 g hydroxidu sodného
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Chloroform:IAA, 24:1:

- 192 ml chloroformu
- 8 ml isoamylalkoholu

Kyselina dusičná, 1% roztok:

- 12 ml 65% kyseliny dusičné
- 800 ml deionizované vody

MgCl₂ pro aTaq polymerázu, 25 mmol·l⁻¹:

- 90 ml deionizované vody
- 0,508 g hexahydrátu chloridu hořečnatého MgCl₂·6H₂O
- po rozpuštění doplnit na 100 ml

Na₂EDTA, 0,5 mol·l⁻¹ zásobní roztok:

- 186,12 g dihydrátu ethylendiaminotetraoctanu sodného Na₂EDTA·2H₂O
- rozpustit v 800 ml deionizované vody
- upravit pH na hodnotu 8,0 pomocí pevného NaOH
- objem doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml

Nanášecí pufr pro elektroforézu v PAA gelu:

- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu
- 0,125 g bromfenolové modře
- 0,125 g xylenové modře

Octan sodný, 3 mol·l⁻¹:

- 81,65 g octanu sodného
- rozpustit ve 200 ml deionizované vody
- pH upravit pomocí ledové kyseliny octové na hodnotu 5,2

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

- 1 g peroxodisíranu amonného
- 10 ml deionizované vody
- uchovávat v chladničce

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
- 40 µl N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu

Reakční pufr pro aTaq DNA polymerázu, 10x:

- 80 ml deionizované vody
- 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
- pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- po rozpuštění doplnit na 100 ml

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

TBE pufr, 10x zásobní roztok:

- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0
- deionizovanou vodou doplnit do 1000 ml

TE pufr:

- 1 ml Tris o koncentraci 1 mol·l⁻¹, pH 8,0
- 0,2 ml Na₂EDTA o koncentraci 0,5 mol·l⁻¹
- doplnit do 100 ml deionizovanou vodou

Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody
- uložit do chladničky
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného Na₂S₂O₃

4.5 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Chlazená centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette - 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (Thermo LabSystems)

- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- pH metr pH 210 (Hanna Instruments)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- Ultracentrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vyhřívaný blok (Labnet International)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

4.6 Izolace DNA

1. Navážit 0,5 g listů rakytníku řešetlákového.
2. Do předchlazené (4 °C) porcelánové třecí misky vložit navážené listy.
3. Listy zalít tekutým dusíkem a rozdrtit tloučkem na jemný prášek.
4. Ke 2 ml CTAB pufru přidat 30 µl β-merkapt ethanolu a tento roztok přidat k prášku a homogenizovat na jemnou kaši.
5. Homogenát přelít do 2ml mikrozkuhavky.
6. Mikrozkuhavku s homogenní směsí pečlivě zvortexovat a poté inkubovat hodinu a půl ve vodní lázni při 70 °C. Po každých 10 minutách mikrozkuhavku vytáhnout, zvortexovat a vrátit do vodní lázně.
7. Po inkubaci homogenát centrifugovat po dobu 10 minut při 13 000 g.
8. Poté přepipetovat supernatant do nové mikrozkuhavky.
9. Do mikrozkuhavky přidat 1 ml roztoku směsi chloroform:IAA v poměru 24:1, intenzivně zvortexovat a centrifugovat 5 minut při 13 000 g.

10. Vrchní vodnou fázi odpipetovat do nové mikrokumavky, do které opět přidat 1 ml roztoku směsi chloroform:IAA v poměru 24:1, pečlivě zvortexovat a centrifugovat 5 minut při 13 000 g.
11. Do nové mikrokumavky přepipetovat supernatant, přidat 100 µl roztoku octanu sodného a zbytek objemu mikrokumavky doplnit isopropylalkoholem.
12. Převrácením promíchat. Dát do mrazáku (−20 °C) na 30 minut.
13. Centrifugovat 20 minut při 15 000 g ve vychlazené centrifuze na 4 °C.
14. Supernatant odlít, mikrokumavku osušit o ubrousek.
15. Poté do mikrokumavky přidat 1 ml 70% ethanolu, převrácením promíchat.
16. Centrifugovat 10 minut při 15 000 g ve vychlazené centrifuze na 4 °C.
17. Slít supernatant, špičkou opatrně odsát zbytek roztoku kolem sedimentu.
18. Nechat volně vyschnout nebo vysušit v termobloku 2 hod při 55 °C.
19. K peletu přidat 1 ml TE pufru a nechat 1 hod v termobloku při 55 °C. Po každých 15 minutách mikrokumavku vytáhnout, zvortexovat a vrátit do termobloku.
20. Změřit koncentraci vyizolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.
21. Podle naměřené koncentrace naředit vyizolovanou DNA v rozmezí 5–10 µg·ml⁻¹ a vzorky uchovat při −20 °C.

4.7 PCR amplifikace DNA rakytníku řešetlákového

PCR amplifikace byla provedena na genomické DNA 46 potencionálně geneticky odlišných kultivarů rakytníku řešetlákového. PCR reakční směs byla připravena a do každého PCR mixu byl přidán jeden pár testovaných primerů.

1. Rozmrazit veškeré složky PCR mixu, poté zvortexovat a krátce zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrokumavek napipetovat složky PCR mixu dle Tabulky č. 4 a poté PCR mix zvortexovat a krátce zcentrifugovat.

Tabulka č. 4: Složení PCR reakční směsi pro 46 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování).

Složky PCR mixu	Koncentrace zásobního roztoku	Objem složek [μl]
Deionizovaná voda	-	300,0
Reakční pufr	10x	46,0
Roztok MgCl_2	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	27,0
Roztok dNTPs	20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	5,0
Primer F	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	22,5
Primer R	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	22,5
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10,0

- Do 46 předem připravených a popsanych PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml napipetovat 1 μl genomické DNA rakytníku řešetlákového a dále napipetovat 9 μl připraveného PCR mixu.
- Uzavřené mikrozkušavky vložit do termocyklu, kdy základní časový a teplotní profil PCR reakce je uveden v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok PCR	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Doba trvání	Počet opakování
Úvodní denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	30 s	
<i>Annealing</i>	*	30 s	35
Elongace	72	30 s	
Finální elongace	72	7 min	1

Pozn.: * teploty *annealingu* pro jednotlivé páry primerů byly použity podle optimalizace v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022), v případě potřeby byly dále upravovány (viz kapitola Výsledky).

4.8 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Separace PCR produktů byla provedena za denaturujících podmínek v 6% polyakrylamidovém gelu, kdy gel byl nalit mezi 2 skla o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťka gelu byla 0,4 mm. Následně separace PCR produktů

probíhala ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra). Celý postup je rozdělen do několika kroků a je popsán níže.

Ošetření skel:

1. Plochy obou skel (velkého a malého), jenž se budou dotýkat gelu, důkladně 2x opláchnout deionizovanou vodou, osušit, 2x opláchnout 96% ethanolem a opět osušit papírovým ubrouskem.
2. Větší sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (Rain-off - tekuté stěrače, Sheron). Přípravek rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, poté opláchnout 2x deionizovanou vodou a osušit papírovým ubrouskem.
3. V digestoři ošetřit plochu menšího skla, která se bude dotýkat gelu, 1 ml roztoku 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Roztok rozetřít po celé ploše papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, poté ošetřenou plochu skla 4x opláchnout 96% ethanolem a pokaždé osušit papírovým ubrouskem.
4. Na rovnou polystyrenovou podložku v digestoři umístit větší sklo ošetřenou plochou nahoru, na něj po jeho delších okrajích položit dva 0,4 mm silné spacers a na ně položit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Spacerů umístit až do kraje skel, gumu spaceru přiložit k menšímu sklu tak, aby se jej těsně dotýkala. Na jedné kratší straně jsou hrany skel přesně v zákrytu, na protilehlé kratší straně jsou konce skel vzájemně posunuty přibližně o 2,5 cm. V místě spacerů skla na každé straně sepnout dvěma klipsy.

Příprava 6% roztoku polyakrylamidového gelu:

1. Gel připravit v kádince smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid:N,N'-metylenbisakrylamid 19:1, 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu.
2. Roztok dobře promíchat a pomalu ho nalévat mezi skla. Aby se předešlo vzniku vzduchových bublin v gelu, je třeba při lití gelu lehce poklepávat na sklo.
3. Když je vyplněn celý prostor mezi skly gelem, vsunout mezi skla v místě, kde se plnil tento prostor gelem, hřebínek jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hluboko. V místě hřebínku skla sepnout 4 klipsy. Gel nechat nejméně hodinu polymerizovat.

Elektroforetická separace:

1. Po ztuhnutí gelu odstranit všechny klipsy a skla důkladně omýt vodou a pomocí kartáčku zbavit od všech zbytků polyakrylamidu, se zvláštním důrazem a opatrností v oblasti hřebínku. Menší sklo poté osušit a pevně upevnit pomocí šroubovacích úchytů do elektroforetické komůrky hranou s hřebínkem nahoru a menším sklem k hliníkové desce elektroforetické komůrky. Uzavřít bočním ventilem vypouštěcí kanálek pro pufr.
2. Katodový i anodový prostor zalít 0,5x TBE pufrem, opatrně vytáhnout hřebínek a vzniklou mezeru mezi skly dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor uzavřít, nasadit elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Za těchto podmínek nechat gel předežhřát 30 minut.
3. Během nahřívání gelu si připravit vzorky, ke každému produktu PCR přidat 5 μ l nanášecího pufru. Poté vzorky vložit do termocykleru a nechat denaturovat po dobu 3 minut. Po denaturaci vzorky okamžitě umístit do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
4. Během denaturace vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit katodu, otevřít katodový prostor a znovu dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky mezeru pro hřebínek od zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do této mezery mezi skly vsunout hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu tak, aby nedošlo k ulomení některého zoubku.
5. Pomocí osmikanálové pipety nanést po 2 μ l připravených vzorků do mezer mezi zoubky hřebínku. Na všechny vzorky použít tytéž špičky, ty mezi nanášením rozdílných vzorků pročistit několikerým nasátím a vypuštěním pufru z katodového prostoru pipetou. Po napipetování všech vzorků katodový prostor uzavřít, nasadit elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA).
6. Čas separace vzorků závisí na relativních molekulových hmotnostech rozdělovaných PCR produktů. Orientačně je možné se řídit pomocí barviv

v nanášecím pufru, jimiž jsou bromfenolová modř a xylenová modř, které ukazují průběh elektroforézy. Přičemž platí, že v 6% polyakrylamidovém gelu se bromfenolová modř pohybuje stejně rychle jako řetězce DNA dlouhé přibližně 25 párů bází a xylenová modř jako řetězce DNA dlouhé přibližně 100 párů bází. Obvyklá doba separace vzorků je 1–3 hodiny.

7. Během elektroforetického dělení vzorků připravit následující roztoky: 800 ml roztoku 10% kyseliny octové (fix/stop roztok), 800 ml roztoku 1% HNO_3 a 800 ml 3% roztoku Na_2CO_3 (vývojka). Vývojku jako jedinou umístit do chladničky, aby se vychladila na teplotu nižší než 10°C .
8. Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a kolečkem na pravé straně elektroforetické komůrky otevřít kanálek, kterým pufr z katodové části přeteče do sběrného prostoru, povolit šrouby úchytných skel a skla s gelem vyjmout a položit do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly opatrně vytáhnout oba spacery a hřebínek a skla od sebe odpáčit pomocí čepele nože.

Vizualizace gelu:

1. Menší sklo s přilepeným gelem otočit gelem nahoru a uložit do fotomisky (též gelem nahoru), umístit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku na gel je přibližně 20 minut a orientačně je možné charakterizovat dostatečný čas působení vymytím modrého pruhu xylenové modře z gelu do roztoku. Fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem promýt 3x přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody.
2. Následně promýt gel na třepačce v 1% roztoku HNO_3 po dobu 4 minut, vylít tento roztok do odpadu a promýt gel 4x přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody.
3. Do roztoku 0,1% AgNO_3 přidat 1,2 ml formaldehydu. Sklo s gelem přemístit do další fotomisky a umístit na třepačku. Zalít připraveným roztokem 0,1% AgNO_3 a nechat působit po dobu 30 minut.
4. Na konci této doby připravit jednu fotomisku s 1–2 l deionizované vody a do 800 ml vychlazené vývojky přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

5. Po uplynutí 30 minut fotomisky s gelem v roztoku AgNO_3 sejmout z třepačky a roztok slít zpět do zásobní láhve. Sklo s gelem vyjmout a na 5 vteřin ponořit do misky s deionizovanou vodou, nechat okapat a přemístit do fotomisky pro vývojkou, umístit na třepačku a zalít gel vývojkou, kde se sleduje vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
6. Když jsou proužky již dostatečně zřetelné a ještě, než začne vystupovat tmavé pozadí, vyvíjení zbarvení zastavit přilítím fix/stop roztoku uchovaného z kroku 1. Roztok nechat působit na gel 2 minuty. Dobu působení je možné orientačně odhadnout podle toho, jestli z roztoku ještě masivně uniká v podobě bublinek vyloučený CO_2 .
7. Sklo s gelem poté ponořit asi na 2 minuty do deionizované vody, a pak přenést na 30 minut do sušárny, kde se gel při $90\text{ }^\circ\text{C}$ vysuší.
8. Usušený gel vyhodnotit na negatoskopu a poté naskenovat.
9. Sklo s již nepotřebným gelem ponořit na několik desítek minut až několik hodin do roztoku NaOH o koncentraci $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Gel by se měl kompletně odlepit a pokud ne, tak jej ze skla strhnout pomocí škrabky. Sklo se umyje a je znovu k použití.

4.9 Statistické vyhodnocení výsledků

Získané genotypy kultivarů rakytníku řešetlákového byly zpracovány pomocí populačně-genetického programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). Pomocí tohoto programu byly u kultivarů rakytníku řešetlákového stanoveny hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E), hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_o), polymorfní informační obsah (PIC) a frekvence výskytu nulových alel. Dále bylo zjištěno, jestli jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze. Také byl použit program Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) pro zjištění, zda jsou testované lokusy ve vazbě.

5 Výsledky

V praktické části své diplomové práce jsem se zaměřila na analýzu a charakterizaci vybraných polymorfních mikrosatelitů, které jsem v rámci své bakalářské práce (Grygarová, 2022) označila jako polymorfní a dobře hodnotitelné a které by bylo možné použít pro kultivarové odlišení odrůd rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*) pěstovaných v České republice. V bakalářské práci jsem testovala 48 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů, které již byly v dřívějších studiích popsány jako polymorfní u asijských poddruhů rakytníku řešetlákového. Tyto primery jsem testovala na DNA 6 různých kultivarů rakytníku řešetlákového, které jsou běžně pěstovány v České republice. V mé bakalářské práci bylo celkem 36 párů primerů, které poskytly polymorfní a dobře hodnotitelné produkty a z nich jsem vybrala 22 párů primerů, které jsem použila v praktické části této diplomové práce. Těchto 22 párů primerů jsem testovala na DNA 46 rostlinných vzorků, kdy se mělo jednat o 43 různých kultivarů rakytníku řešetlákového prodáváných v České republice a 3 rostliny bez kultivarového určení.

Po izolaci DNA a následném naředění vyizolované DNA 46 rostlinných vzorků jsem provedla PCR amplifikaci pomocí 22 párů primerů. Pro každý pár primerů jsem použila nejprve teplotu *annealingu* (T_a), která byla označena jako finální v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022). V kontextu genotypizace velkého množství jedinců jsem zjistila, že většina mikrosatelitů vykazující polymorfismus neposkytuje dobře hodnotitelné produkty, a proto jsem musela upravit teploty *annealingu*, které jsou uvedené v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022). Pokud byl PCR produkt velmi slabý, upravila jsem teplotu *annealingu* snížením o 1–2 °C a pokud byl naopak PCR produkt až moc silný a špatně hodnotitelný, tak jsem teplotu *annealingu* zvýšila. Finální teploty *annealingu* všech párů primerů se pohybovaly v rozmezí od 52 do 67 °C. Následně jsem provedla elektroforetickou separaci PCR produktů. Délka elektroforetické separace byla také v některých případech upravována. Čas elektroforetické separace PCR produktů jednotlivých mikrosatelitů se pohyboval od 90 do 200 minut. V případě jednoho mikrosatelitního lokusu, konkrétně SB 7, jsem musela k PCR produktu přidat větší množství nanášecího pufu, a to 15 μ l namísto 5 μ l, protože pro lepší hodnocení tohoto mikrosatelitu bylo třeba PCR produkt více naředit.

Celkově jsem otestovala 22 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů na 46 potencionálně geneticky odlišných kultivarech rakytníku řešetlákového. Z těchto 22

párů primerů poskytlo dobře hodnotitelný polymorfní produkt celkem 18 párů primerů (viz Tabulka č. 6). Celkově 4 mikrosatelitní lokusy jsem z dalšího testování vyřadila, jelikož se jednotlivé alely nedaly jednoznačně od sebe odlišit, a tudíž jsem nemohla určit genotypy jednotlivých kultivarů. Konkrétně se jednalo o mikrosatelity USSM 1, USSM 13, USSM 16 a SB 9. U mikrosatelitu USSM 13 jsem se nejprve domnívala, že je monomorfní, ale další analýzou jsem zjistila, že vykazuje nízký polymorfismus, avšak je hodně špatně hodnotitelný, a proto jsem ho vyřadila. Další 3 mikrosatelity (USSM 1, USSM 16 a SB 9) vykazovaly vysoký polymorfismus, ale ani jeden nebyl spolehlivě hodnotitelný, a proto jsem i je z dalšího experimentu vyřadila. Celkově jsem pro amplifikaci 46 potencionálně geneticky odlišných kultivarů rakytníku řešetlákového vybrala 18 párů primerů, které poskytly polymorfní a dobře hodnotitelný produkt.

Těchto 18 polymorfních mikrosatelitů jsem analyzovala a charakterizovala pomocí populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Díky programu Cervus 3.0.7 jsem získala informace o pravděpodobnosti výskytu nulových alel a Hardy-Weinbergově rovnováze jednotlivých lokusů (viz Tabulka č. 6). Dále jsem získala informace o hodnotách očekávané heterozygotnosti (H_E), hodnotách pozorované heterozygotnosti (H_o) a polymorfním informačním obsahu (PIC) (viz Tabulka č. 7). Pomocí programu Genepop 4.7.5 jsem zjistila, zda jsou testované lokusy ve vazbě.

Do analýz programů Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5. jsem nezařadila všech 46 rostlin, protože jsem v mnoha případech zjistila zcela genetickou totožnost rostlin nebo odlišnost pouze v jednom mikrosatelitu, o čemž podrobněji pojednávám na straně 46. Tyto rostliny jsem vyřadila a považuji je za totožné, protože u odlišnosti pouze u jednoho mikrosatelitu si nemohu být jistá, vzhledem k tomu, že už jsem analýzy znovu neopakovala, zdali se nejedná o špatně vyhodnocený PCR artefakt. Na druhou stranu tyto rostliny už fungují v pěstitelské praxi povětšinou mnoho desítek let a je možné, že v rámci vysoké frekvence mutací v mikrosatelitech se tentýž genetický materiál rozešel. Charakteristika pomocí těchto programů probíhala pouze na 32 jedincích vykazujících unikátní genotypy, tj. že se liší alespoň v genotypu na 4 z 18 mikrosatelitů. Programem Cervus 3.0.7 bylo nalezeno v průměru 5,8 alel na lokus. Průměrná očekávaná heterozygotnost (H_E) byla 0,6375 a průměrný polymorfní informační obsah (PIC) byl 0,5792. Také byla vypočtena pravděpodobnost, že budou mít 2 náhodně vybraní jedinci stejnou alelovou konstituci všech polymorfních lokusů, která činila $6,506 \cdot 10^{-15}$ (viz Příloha 1).

Tabulka č. 6: Charakteristika 18 polymorfních a hodnotitelných lokusů, které byly testovány na 32 geneticky odlišných kultivarech rakytníku řešetlákového. V tabulce je uveden název lokusu, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel (N), délka elektroforetické separace (ELFO), teplota *annealingu* (T_a), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) a pravděpodobnost výskytu nulových alel (F).

Název lokusu	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice ^Δ	N	ELFO [min]	T_a [°C]	HW	F [%]
USSM 3	F: AAGGATGTGGTCGATCCAAG R: GTTTGCAGGCATTCCTTTGT	TTC	12	150	67	NS	-
USSM 5	F: TTCGATCGGATAAGGTCATTG R: GCAGTCGAGGAGGTTTGAAG	AC/AT	7	200	66	NS	8,68
USSM 7	F: TCGCCGTCTGTTTCAGATAA R: GCTGATCCAACGGTCTCATT	AG	9	120	66	NS	-
USSM 25	F: CGAGGTCCGAGTAGGAAGA R: CATTGGCCTTCAATCTCCTC	AAG	9	180	64	NS	15,85
USSM 30	F: GAAAGTCCTCGTCTTCCTCT R: AGAGGAAGGGAGATAGATGG	TTCTC	3	120	52	NS	9,10
USSM 50	F: GGTCAGCCAAAGCAGTAAGT R: CGTGTTAGGCTAGCTTTAGG	CTCCTT	4	90	57	NS	6,13
SB 2	F: ATGTGGATTGGTTTAGCAAACT R: ACTCGACAAAATCCCCTAAAGG	neuveдено	3	90	66	ND	11,29
SB 3	F: GTCACAAGGGCTAATGTTACTGC R: GCAATGGGTTTAAGGGTATGAGT	neuveдено	8	120	65	***	-
SB 4	F: ACCTCTAGGATTTCACTTTCTTGT R: GGTCGTATCCATATGACACTCGT	neuveдено	6	120	64	NS	12,15
SB 7	F: TGGAAATAGTAACAATGGGCAGT R: GTTCACGAATTCATCTGCTTCT	neuveдено	2	90	64	NS	10,30
SB 8	F: AGAGATAGTGGAGTAAGTCCCGC R: CAAATCGAAGAAGTGATCAGGTTA	neuveдено	4	90	66	NS	5,42

Tabulka č. 6: Pokračování.

Název lokusu	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice ^Δ	N	ELFO [min]	T _a [°C]	HW	F [%]
SB 10	F: ATAAACAAATGGGCAAATCAGTG R: TTCTTCTTCATCACCACAATCCT	neuvedeno	5	120	64	*	36,99
SB 11	F: TGTATACTCCCCACCAACAACAT R: GTGATGACATCGTATCCAGATCA	neuvedeno	3	90	54	NS	-
SB 13	F: AAGCTGGAGGAAGTAGAGTAGCC R: TGATATTTTTGATTCAGGGATCG	neuvedeno	4	90	64	NS	30,96
SB 14	F: GATTTGCTTTTCCTTAAAGCTGG R: ATCAAAAAGAAGGAAACCCAGAAG	neuvedeno	4	140	63	NS	2,71
SB 18	F: GAGTTAATCGATGGATAATGATTG R: TTCCTTCATTTGAAACCTCATT	neuvedeno	6	170	60	NS	14,31
SB 20	F: TGTTCTGCTAAGAACTTCAACCA R: TTCAGAAATTACTGCAGACATGA	neuvedeno	12	150	55	NS	-
SB 22	F: TCAGTCATATTACAATTCACACGG R: TCACAACCTTAACATTTCAACCA	neuvedeno	4	120	63	NS	-

Legenda:

^Δ - jednotka repetice je v tabulce uvedena pouze v případě, pokud ji samotní autoři uvádí ve své publikaci

ND - lokus nelze hodnotit, zda je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou

NS - lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou

* - signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 5 %

*** - signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %

Amplifikací 18 párů primerů u 32 jedinců rakytníku řešetlákového se mi podařilo detekovat 2–12 alel na lokus. Nejvíce alel (12) jsem detekovala u dvou lokusů, a to u USSM 3 a SB 20. Naopak nejméně alel (2) jsem detekovala u jednoho lokusu, a to u SB 7. Celkově jsem detekovala 2 alely u jednoho lokusu, 3 alely u tří lokusů, 4 alely u pěti lokusů, 5 alel u jednoho lokusu, 6 alel u dvou lokusů, 7 alel u jednoho lokusu, 8 alel u jednoho lokusu, 9 alel u dvou lokusů a 12 alel u dvou lokusů. Dále jsem zjistila u jednotlivých mikrosatelitů 3–20 různých genotypů, kdy největší počet genotypů (20) byl u mikrosatelitů USSM 3 a SB 20. U všech 18 mikrosatelitů jsem určila počet alel, počet genotypů, očekávanou heterozygotnost (H_E), pozorovanou heterozygotnost (H_o) a polymorfní informační obsah (PIC) (viz Tabulka č. 7).

Tabulka č. 7: 18 polymorfních a dobře hodnotitelných mikrosatelitních lokusů testovaných na 32 jedincích rakytníku řešetlákového. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, počet alel, počet genotypů, očekávaná heterozygotnost (H_E), pozorovaná heterozygotnost (H_o) a polymorfní informační obsah (PIC).

Mikrosatelit	Počet alel	Počet genotypů	H_E	H_o	PIC
USSM 3	12	20	0,897	0,938	0,872
USSM 5	7	10	0,632	0,531	0,568
USSM 7	9	16	0,825	0,875	0,790
USSM 25	9	11	0,610	0,438	0,578
USSM 30	3	6	0,621	0,500	0,539
USSM 50	4	8	0,629	0,563	0,560
SB 2	3	4	0,201	0,156	0,183
SB 3	8	12	0,828	0,813	0,790
SB 4	6	10	0,669	0,531	0,615
SB 7	2	3	0,507	0,406	0,375
SB 8	4	9	0,705	0,625	0,632
SB 10	5	10	0,522	0,250	0,482
SB 11	3	3	0,466	0,594	0,411
SB 13	4	8	0,593	0,313	0,496
SB 14	4	10	0,740	0,688	0,677
SB 18	6	9	0,629	0,469	0,550
SB 20	12	20	0,847	0,906	0,816
SB 22	4	7	0,552	0,563	0,491

Analýza programem Cervus 3.0.7 ukázala, že celkem 15 z 18 mikrosatelitních lokusů je v Hardy-Weinbergově rovnováze a v Tabulce č. 6 jsou označeny NS. Pouze u jednoho tříalelového lokusu SB 2 nebyl program Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) schopen určit, zda je v Hardy-Weinbergově rovnováze a v Tabulce č. 6 je označen ND. U mikrosatelitního lokusu SB 10 program Cervus 3.0.7 určil, že signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy je na hladině významnosti 5 %. U mikrosatelitního lokusu SB 3 program Cervus 3.0.7 určil, že signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy je na hladině významnosti 0,1 %. Dále byla programem Cervus 3.0.7 určena pravděpodobnost výskytu nulových alel. Celkem u 6 lokusů není předpokládán výskyt nulových alel. Nejvyšší pravděpodobnost výskytu nulových alel (36,99 %) byla zaznamenána u pětialelového lokusu SB 10. U 6 lokusů byla pravděpodobnost výskytu nulových alel v rozmezí 10–31 % a u dalších 5 lokusů byla v rozmezí 5–10 % (viz Příloha 1).

Dále analýza programem Cervus 3.0.7 stanovila hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E) a pozorované heterozygotnosti (H_O). Vzhledem k inbrední populaci byla u většiny lokusů pozorovaná heterozygotnost (H_O) nižší než očekávaná heterozygotnost (H_E), někdy až poloviční (např. u SB 10). Ale v některých případech byla pozorovaná heterozygotnost (H_O) vyšší, než by odpovídalo Hardy-Weinbergovu zákonu, a to u 5 lokusů (USSM 3, USSM 7, SB 11, SB 20 a SB 22).

Programem Genepop 4.7.5 jsem zjišťovala, zda jsou testované lokusy ve vazbě. Analýza programem Genepop 4.7.5 ukázala, že 30 dvojic ze 153 dvojic mikrosatelitních lokusů je v silné vazbě. To může být způsobeno tím, že vždy až několik odrůd rakytníku řešetlákového jsou velmi pravděpodobně potomci jednoho křížení, a tedy se nejedná o nepříbuzné rostliny a určité alely jsou předávány spolu. Proto tyto výsledky nejsou převoditelné na přírodní populaci. Také data udávána programem Cervus 3.0.7 by se pravděpodobně u opravdu nepříbuzných rostlin lišila a je potřeba je brát zatím pouze jako orientační hodnoty, protože prostě jiné zatím nejsou.

Pro identifikaci kultivarů rakytníku řešetlákového jsem použila již zmíněných 18 mikrosatelitních lokusů. Celkem jsem měla 46 vzorků DNA rostlinného materiálu, u kterých jsem zjišťovala genotypy. Mělo se jednat o 43 různých kultivarů rakytníku řešetlákového a 3 rostliny bez kultivarového určení. V Tabulce č. 8 a v Tabulce č. 9 uvádím zjištěné genotypy u všech 46 jedinců.

Tabulka č. 8: Genotypy u 46 kultivarů rakytníku řešetlákového pomocí 6 mikrosatelitů, které publikovali Jain *et al.* (2014) a Jain (2015).

Název kultivaru	USSM 3	USSM 5	USSM 7	USSM 25	USSM 30	USSM 50
'Pollmix'	6/12	5/5	2/4	7/7	2/3	3/3
'Leikora'	6/12	5/5	2/4	7/7	2/3	3/3
'Tarmo'	9/11	7/7	3/3	7/7	3/3	3/3
'Tytti'	9/11	7/7	3/3	7/7	3/3	3/3
'Sluníčko'	2/11	5/7	3/6	1/7	1/3	1/2
'Altajská'	2/11	5/7	3/6	1/7	1/3	1/2
'Dorana'	4/8	2/6	1/2	7/7	2/2	3/4
'Askola'	4/8	2/6	1/2	7/7	2/2	3/4
SAD (samec)	5/9	7/7	3/6	7/7	1/3	1/4
'K+'	5/9	7/7	3/6	7/7	1/3	1/4
SAD sever (samice)	6/6	3/3	2/4	7/7	3/3	3/4
SAD jih (samice)	6/6	3/3	2/4	7/7	3/3	3/4
'Podruga'	5/10	7/7	5/7	4/4	1/1	1/1
'Kapriz'	5/10	7/7	5/5	4/7	1/1	1/1
'Čujská'	5/10	7/7	5/5	4/4	1/1	1/1
'Botanika'	10/11	5/7	3/9	1/7	1/3	1/2
'Baltik'	10/11	5/7	3/9	1/7	1/3	1/2
'Ljubimaja'	10/11	5/7	3/9	1/7	1/3	1/2
'Ananasná'	9/11	5/7	3/5	7/7	1/3	1/3
'Aromat'	9/11	5/7	3/5	7/7	1/3	1/3
'Rosinka'	9/11	5/7	3/5	7/7	1/3	1/3
'Červená Pochodeň'	9/11	5/7	3/5	7/7	1/3	1/3
'Perčik'	9/11	5/7	3/5	7/7	1/3	1/3

Tabulka č. 8: Pokračování.

Název kultivaru	USSM 3	USSM 5	USSM 7	USSM 25	USSM 30	USSM 50
'Nela'	9/10	5/7	5/6	3/7	1/1	1/1
'Lotta'	10/12	5/7	3/3	1/7	1/3	1/3
'Sirola'	9/11	5/7	3/5	7/7	1/3	1/1
'Hergo'	4/12	5/7	1/5	2/6	2/2	3/4
'Julia'	9/11	2/5	2/8	1/7	1/3	1/3
'Romeo'	9/11	2/4	2/5	1/7	1/3	1/3
'Moskevská Krasavice'	10/11	4/7	4/5	7/7	1/3	1/3
'Otto'	3/10	5/5	3/5	7/7	1/3	1/3
'Krasavice'	10/11	5/7	3/5	1/7	1/3	1/3
'Žemčužina'	5/9	7/7	5/7	7/7	1/1	1/1
'Parád'	2/5	1/5	5/7	4/7	1/1	1/1
'Sudaruška'	9/10	7/7	8/9	7/7	1/1	1/1
'Friesdorfer Orange'	11/11	5/5	2/2	2/7	2/2	2/3
'Voroběvská'	10/11	7/7	3/9	7/7	1/3	1/2
'Bohatýr'	1/7	7/7	3/5	7/7	1/1	1/1
'Elizaveta'	2/8	7/7	5/7	4/4	1/1	1/1
'Tenga'	5/8	5/7	3/7	4/4	1/1	1/1
'Sandora'	4/6	7/7	2/5	2/7	2/3	3/4
'Inja'	4/5	5/7	3/5	9/9	1/1	1/1
'Eva'	3/5	5/7	4/5	7/7	1/2	1/3
'Pantělejevská'	5/8	7/7	5/5	5/9	1/1	1/1
'Frugana'	4/12	1/2	1/5	2/5	2/2	4/4
'Habego'	4/6	7/7	4/5	7/8	2/3	3/4

Tabulka č. 9: Genotypy u 46 kultivarů rakytníku řešetlákového pomocí 12 mikrosatelitů, které publikovali Li *et al.* (2020).

Název kultivaru	SB 2	SB 3	SB 4	SB 7	SB 8	SB 10	SB 11	SB 13	SB 14	SB 18	SB 20	SB 22
'Pollmix'	2/2	5/5	3/3	2/2	4/4	3/3	2/3	4/4	1/1	1/6	6/6	2/3
'Leikora'	2/2	5/5	3/3	2/2	4/4	3/3	2/3	3/4	1/1	1/6	6/6	2/3
'Tarmo'	2/2	5/7	3/6	2/2	3/4	3/3	2/2	4/4	1/3	5/5	11/11	3/3
'Tytti'	2/2	5/7	3/6	2/2	3/4	3/3	2/2	2/4	1/3	5/5	11/11	3/3
'Sluníčko'	2/3	1/2	3/3	1/2	2/4	2/2	2/2	3/3	1/3	5/5	3/11	3/4
'Altajská'	2/3	1/2	3/3	1/2	2/4	2/2	2/2	3/3	1/3	5/5	3/11	3/4
'Dorana'	2/2	6/8	2/3	2/2	2/3	3/3	2/3	3/3	2/2	4/5	11/12	2/4
'Askola'	2/2	6/8	2/3	2/2	2/3	3/3	2/3	3/3	2/2	4/5	11/12	2/4
SAD (samec)	2/3	1/2	1/3	1/2	3/3	3/3	2/2	2/3	2/3	3/3	8/12	2/4
'K+'	2/3	1/2	1/3	1/2	3/3	3/3	2/2	2/3	2/3	3/3	8/12	2/4
SAD sever (samice)	2/2	6/6	3/5	2/2	4/4	3/3	2/3	1/1	1/2	5/5	11/12	2/4
SAD jih (samice)	2/2	6/6	3/5	2/2	4/4	3/3	2/3	1/1	1/2	5/5	11/12	2/4
'Podruga'	2/2	1/5	1/4	1/1	1/3	3/5	1/2	3/4	4/4	6/6	8/12	4/4
'Kapriz'	2/2	1/5	1/4	1/1	1/3	3/5	1/2	3/4	4/4	6/6	8/12	4/4
'Čujská'	2/2	1/5	1/4	1/1	1/3	3/5	1/2	3/4	4/4	6/6	8/12	4/4
'Botanika'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/4	2/3	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Baltik'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/4	2/3	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Ljubimaja'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/4	2/3	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Ananasná'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/3	2/2	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Aromat'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/3	2/2	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Rosinka'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/3	2/2	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Červená Pochodeň'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/3	2/2	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4
'Perčik'	2/2	1/2	3/3	1/2	3/4	3/3	2/2	4/4	2/4	5/6	11/12	3/4

Tabulka č. 9: Pokračování.

Název kultivaru	SB 2	SB 3	SB 4	SB 7	SB 8	SB 10	SB 11	SB 13	SB 14	SB 18	SB 20	SB 22
'Nela'	3/3	1/3	1/1	1/1	1/2	4/4	2/2	3/3	3/3	6/6	2/5	4/4
'Lotta'	2/3	1/2	3/4	1/2	1/4	1/3	2/3	3/3	2/3	5/6	2/11	3/4
'Sirola'	2/3	1/2	3/3	1/2	3/4	3/3	2/2	3/3	1/4	5/5	3/11	3/4
'Hergo'	2/2	2/8	3/3	2/2	2/4	3/3	2/3	3/3	2/2	2/6	6/8	1/1
'Julia'	2/2	1/2	3/3	1/2	2/3	3/3	2/2	4/4	2/4	5/6	7/11	3/4
'Romeo'	2/2	1/2	3/3	1/2	2/3	3/3	2/3	3/3	2/4	5/6	7/11	3/4
'Moskevská Krasavice'	2/2	1/2	1/3	1/2	4/4	3/3	2/2	4/4	2/4	5/5	5/11	3/4
'Otto'	2/2	3/3	3/3	1/2	3/3	3/3	2/2	4/4	2/3	5/6	7/12	3/4
'Krasavice'	2/2	1/2	3/3	1/2	2/4	3/3	2/2	4/4	1/4	5/6	5/11	3/4
'Žemčuzina'	2/2	3/4	1/4	1/1	3/3	3/5	1/2	3/3	3/4	6/6	5/12	4/4
'Parád'	2/2	1/5	1/1	1/1	2/3	3/5	1/2	3/4	3/3	6/6	7/8	4/4
'Sudaruška'	2/2	1/5	3/4	1/1	2/2	4/5	2/2	3/3	3/4	6/6	12/12	4/4
'Friesdorfer Orange'	2/2	5/8	3/5	2/2	4/4	3/3	2/3	4/4	2/3	5/6	6/11	3/4
'Voroběvská'	2/2	3/4	3/3	1/2	3/4	3/3	2/3	4/4	2/4	5/5	4/11	3/4
'Bohatýr'	2/2	1/5	1/4	1/1	2/3	4/4	1/2	3/4	4/4	6/6	5/12	4/4
'Elizaveta'	2/2	1/5	4/4	1/1	2/2	2/5	1/2	3/4	3/3	6/6	7/8	4/4
'Tenga'	2/2	5/5	4/4	1/1	2/2	1/5	1/2	3/4	3/4	6/6	8/12	4/4
'Sandora'	2/2	5/5	3/5	2/2	3/4	3/3	2/3	1/4	1/2	2/5	6/11	2/4
'Inja'	2/2	1/3	1/4	1/1	2/2	4/4	2/2	3/4	3/4	6/6	11/12	4/4
'Eva'	2/2	3/3	1/6	1/2	3/4	3/3	2/2	3/3	2/3	5/6	2/12	4/4
'Pantělejevská'	2/2	3/5	1/4	1/1	2/2	5/5	1/2	4/4	4/4	6/6	10/11	4/4
'Frugana'	1/2	2/8	3/4	2/2	2/4	3/3	2/3	2/4	2/2	1/4	1/9	1/2
'Habego'	2/2	6/8	3/5	2/2	2/4	3/3	2/3	1/3	2/3	2/5	10/12	4/4

Původně jsem předpokládala, že každý z 46 testovaných jedinců bude mít unikátní genotyp, tzn. že analýzou 18 mikrosatelitů zjistím 46 unikátních genotypů. Ale v 9 případech byly stejné nebo skoro stejné genotypy, konkrétně se jednalo o 2 klastry o 3 jedincích, 1 klastr o 5 jedincích a 6 dvojic kultivarů, které byly geneticky totožné nebo se lišily pouze jedním mikrosatelitem a jedná se tedy velmi pravděpodobně o stejný genetický materiál. Z 46 jedinců bylo opravdu unikátních 23 jedinců (odrůd). Dále jsem vzala vždy po jednom genotypu z geneticky totožných dvojic až pětic, který též беру jako unikátní, protože není totožný s žádným z 23 unikátních genotypů. Celkově jsem tedy zjistila 32 unikátních genotypů rakytníku řešetlákového.

U dvojic 'Sluníčko'/'Altajská' a 'Dorana'/'Askola' jsem zjistila 100% shodu genotypů u všech 18 testovaných mikrosatelitů, a tedy jeden z dvojice nebude téměř jistě daným kultivarem a pro zjištění, o který kultivar se jedná, bude zapotřebí další analýza. Další 100% shodu genotypů u všech 18 testovaných mikrosatelitů jsem zjistila u jedinců SAD (samec) a 'K+'. Neurčená odrůda SAD (samec) je tedy geneticky totožná s odrůdou 'K+', což znamená, že jedinec SAD (samec) je odrůda 'K+'. U dvojice 'Tarmo'/'Tytti' je rozdíl pouze u jedné alely v rámci genotypu u jednoho mikrosatelitu, a to u SB 13, kdy jedinec 'Tarmo' měl genotyp 4/4 a jedinec 'Tytti' měl genotyp 2/4. Oba tyto kultivary jsou původem z Finska, kdy 'Tarmo' je uváděn jako samec a 'Tytti' jako samice. Rostliny, z kterých byl odebrán biologický materiál, jsou mladé, malého věku a zatím nelze rozlišit, zda se opravdu jedná o samce nebo samici. Navíc rozdílný genotyp pouze u jednoho mikrosatelitu není dostatečným důkazem, že se jedná o 2 rozdílné genetické materiály. Proto se u dvojice 'Tarmo'/'Tytti' domnívám, že se jedná o totožný genetický materiál a velmi pravděpodobně se bude jednat o nějakou záměnu v pěstitelském nebo dodavatelském řetězci. Další dvojicí je 'Pollmix'/'Leikora'. Tato dvojice má také rozdíl pouze u jedné alely v rámci genotypu u jednoho mikrosatelitu, a to u SB 13, kdy jedinec 'Pollmix' měl genotyp 4/4 a jedinec 'Leikora' měl genotyp 3/4. Kultivar 'Pollmix' je uváděn jako samec a kultivar 'Leikora' jako samice a oba kultivary jsou původem z Německa. Rostlina, která byla prodána jako kultivar 'Leikora' a z které byl odebrán biologický materiál, letos poprvé kvetla a bylo zjištěno, že se nejedná o samici, ale o samce, tudíž se nemůže jednat o kultivar 'Leikora'. Přestože má dvojice 'Pollmix'/'Leikora' rozdílný jeden genotyp, domnívám se, že jedinec prodáván pod kultivarovým označením 'Leikora' je velmi pravděpodobně kultivar 'Pollmix'. Poslední dvojicí je SAD sever (samice)/SAD jih (samice). U této dvojice jsem zjistila 100% genetickou shodu u všech 18 testovaných

mikrosatelitů. Dvojice SAD sever (samice)/SAD jih (samice) geneticky neodpovídají žádné testované odrůdě, ale sdílí 7 genotypů společně s odrůdou 'Pollmix'. Tato dvojice bez kultivarového určení je velmi pravděpodobně buď sourozenec vzniklý z křížení odkud pochází i 'Pollmix' nebo je to nějaký potomek či rodič kultivaru 'Pollmix'. Dále jsem zjistila 100% genetickou shodu u trojice 'Botanika'/'Baltik'/'Ljubimaja'. Další trojicí je 'Podruga'/'Kapriz'/'Čujská', kdy jedinec 'Podruga' má na rozdíl od dalších dvou rostlin jiný genotyp u mikrosatelitu USSM 7 a jedinec 'Kapriz' má na rozdíl od dalších dvou rostlin jiný genotyp u mikrosatelitu USSM 25. Jak již bylo zmíněno, rozdílný genotyp pouze u jednoho mikrosatelitu není dostatečným důkazem, že se jedná o rozdílné genetické materiály. Dva kultivary z každé trojice byly tedy pravděpodobně prodávány pod špatným pojmenováním a pro zjištění, o který kultivar se ve skutečnosti jedná, bude zapotřebí další analýza. Poslední 100% genetickou shodu jsem zjistila u pětičce 'Ananasná'/'Aromat'/'Rosinka'/'Červená Pochodeň'/'Perčik'. V tomto případě jsou velmi pravděpodobně 4 kultivary špatně pojmenované a rovněž i zde pro zjištění, o který kultivar se ve skutečnosti jedná, bude zapotřebí další analýza.

Některé kultivary lze identifikovat naprosto jednoznačně, protože u jednoho až sedmi mikrosatelitů mají unikátní genotyp, který se u žádného z dalších testovaných jedinců nevyskytoval. Kultivar 'Frugana' má unikátních 7 genotypů. Kultivar 'Nela' má 5 unikátních genotypů. Kultivary 'Habego', 'Lotta', 'Friesdorfer Orange', 'Eva' a 'Pantělejevská' mají každý 4 unikátní genotypy. Kultivary 'Sudaruška' a 'Hergo' mají každý 3 unikátní genotypy. Kultivary 'Otto', 'Elizaveta', 'Inja', 'Julia', 'Tenga' a 'Parád' mají každý 2 unikátní genotypy. Kultivary 'Bohatýr', 'Romeo', 'Moskevská Krasavice', 'Sandora' a 'Voroběvská' mají každý 1 unikátní genotyp. Některé mikrosatelity poskytly unikátní genotypy i u geneticky shodných dvojic či trojic. Dvojice 'Dorana'/'Askola' má 5 unikátních genotypů. Dvojice SAD sever (samice)/SAD jih (samice) má 4 unikátní genotypy. Dvojici 'Tarmo'/'Tytti' má také 4 unikátní genotypy. Dvojice 'K+'/'SAD (samec)' má 3 unikátní genotypy. Dvojice 'Altajská'/'Sluníčko' má 2 unikátní genotypy. Trojice 'Podruga'/'Kapriz'/'Čujská' má také 2 unikátní genotypy. Dvojice 'Pollmix'/'Leikora' má 1 unikátní genotyp. Trojice 'Botanika'/'Baltik'/'Ljubimaja' má také 1 unikátní genotyp. V Tabulce č. 10 jsou uvedeny všechny mikrosatelity, které poskytly unikátní genotyp, včetně kultivaru, pro který unikátní genotyp poskytly, a konkrétního genotypu.

Pětičce 'Ananasná'/'Aromat'/'Rosinka'/'Červená Pochodeň'/'Perčik' a kultivary 'Sirola', 'Krasavice' a 'Žemčužina' nevykazují žádný unikátní genotyp na žádném

mikrosatelitu. A celkem 3 mikrosatelity neposkytly žádné unikátní genotypy pro žádnou odrůdu, a to mikrosatelity SB 7, SB 11 a SB 14.

Toto je samozřejmě zatím jen částečně využitelná informace, neboť nebyly otestovány všechny kultivary rakytníku řeštlákového, které se v rámci České republiky pěstují. Na druhou stranu nebyly zatím genotypovány všechny potenciálně využitelné mikrosatelity, které mohou další nové unikátní genotypy poskytnout.

Tabulka č. 10: Seznam mikrosatelitů a unikátních genotypů, které poskytly. V tabulce jsou uvedené názvy mikrosatelitů, konkrétní unikátní genotypy a názvy kultivarů.

Kultivar	USSM3	USSM5	USSM7	USSM25	USSM30	USSM50	SB2	SB3	SB4	SB8	SB10	SB13	SB18	SB20	SB22
'Frugana'	-	1/2	-	2/5	-	4/4	1/2	-	-	-	-	-	1/4	1/9	1/2
'Nela'	-	-	5/6	3/7	-	-	3/3	-	-	1/2	-	-	-	12/5	-
'Habego'	-	-	-	7/8	-	-	-	-	-	-	-	1/3	-	10/12	1/1
'Lotta'	10/12	-	-	-	-	-	-	-	-	1/4	1/3	-	-	2/11	-
'Frie. Oran.'	11/11	-	2/2	-	-	2/3	-	5/8	-	-	-	-	-	-	-
'Eva'	3/5	-	-	-	1/2	-	-	-	1/6	-	-	-	-	2/12	-
'Pantělej.'	-	-	-	5/9	-	-	-	3/5	-	-	5/5	-	-	10/11	-
'Sudaruška'	-	-	8/9	-	-	-	-	-	-	-	4/5	-	-	12/12	-
'Hergo'	-	-	-	2/6	-	-	-	-	-	-	-	-	2/6	6/8	-
'Otto'	3/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7/12	-
'Elizaveta'	2/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/5	-	-	-	-
'Inja'	4/5	-	-	9/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'Julia'	-	2/5	2/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'Tenga'	-	-	3/7	-	-	-	-	-	-	-	1/5	-	-	-	-
'Parád'	3/7	1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'Bohatýr'	1/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka č. 10: Pokračování.

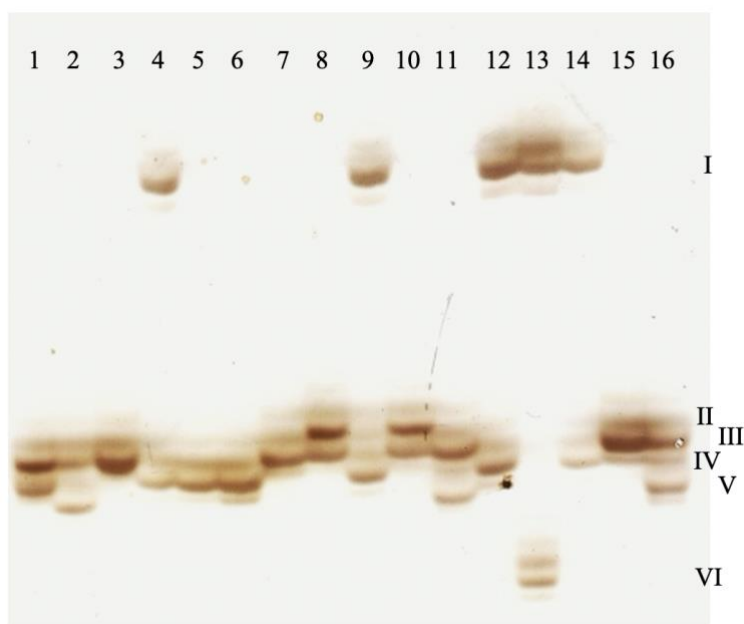
Kultivar	USSM3	USSM5	USSM7	USSM25	USSM30	USSM50	SB2	SB3	SB4	SB8	SB10	SB13	SB18	SB20	SB22
'Romeo'	-	2/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'Mosk. Kras.'	-	4/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'Sandora'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/4	-	-	-
'Voroběv.'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/11	-
'Dor.'/'Ask.'	4/8	2/6	1/2	-	-	-	-	-	2/3	-	-	-	4/5	-	-
SAD s. a j.	6/6	3/3	-	-	-	-	-	6/6	-	-	-	1/1	-	-	-
'Tar.'/'Tyt.'	-	-	-	-	-	-	-	5/7	3/6	-	-	-	-	11/11	3/3
'K+'/'SAD	-	-	-	-	-	1/3	-	-	-	-	-	2/3	3/3	-	-
'Alta.'/'Slu.'	2/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2	-	-	-	-
'P.'/'K.'/'Č.'	5/10	-	-	-	-	-	-	-	-	1/3	-	-	-	-	-
'Poll.'/'Lei.'	6/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'B.'/'B.'/'L.'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/4	-	-	-	-
Suma	13	7	6	6	1	3	2	4	3	3	7	4	4	11	3

Legenda:

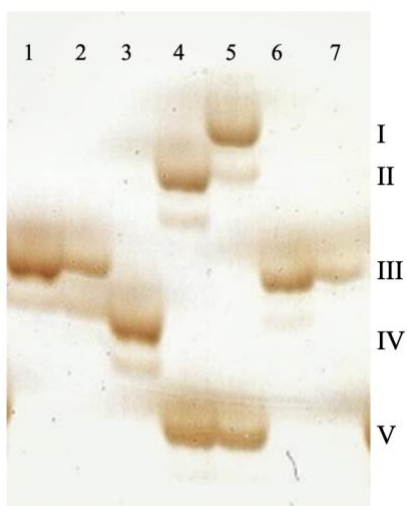
Suma = počet unikátních genotypů, které daný mikrosatelit poskytl testováním na 32 geneticky odlišných rostlinách

'Frie. Oran.' = 'Friesdorfer Orange'; 'Pantělej.' = 'Pantělejevská'; 'Mosk. Kras.' = 'Moskevská Krasavice'; 'Voroběv.' = 'Voroběvská'; 'Dor.'/'Ask.' = 'Dorana'/'Askola'; SAD s. a j. = SAD sever (samice)/SAD jih (samice); 'Tar.'/'Tyt.' = 'Tarmo'/'Tytti'; 'K+'/'SAD = 'K+'/'SAD (samec); 'Alta.'/'Slu.' = 'Altajská'/'Sluníčko'; 'P.'/'K.'/'Č.' = 'Podruga'/'Kapriz'/'Čujská'; 'Poll.'/'Lei.' = 'Pollmix'/'Leikora'; 'B.'/'B.'/'L.' = 'Botanika'/'Baltik'/'Ljubimaja'

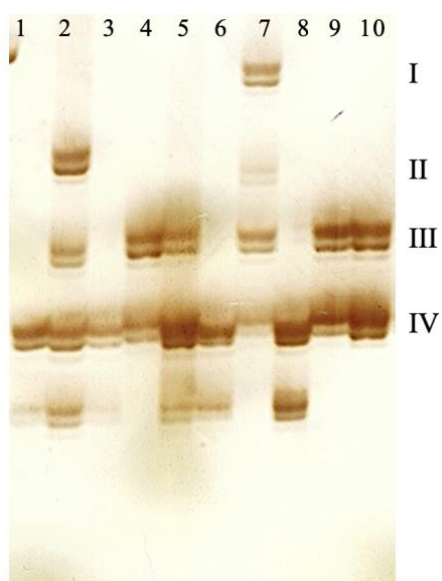
Pro hodnocení mikrosatelitů je důležité, jestli jsou jednotlivé alely dostatečně zřetelné a jestli se nevyskytují žádné přídavné produkty, které by zhoršovaly hodnocení. Proto je nutné určit optimální podmínky PCR amplifikace, jako je například vhodná teplota *annealingu* nebo koncentrace hořčičných iontů, dále je důležitá délka elektroforetické separace a rovněž výsledný elektroforetogram. Na obrázcích 2, 3 a 4 jsou výřezy z naskenovaných gelů, kde jsou elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace vybraných mikrosatelitních lokusů.



Obrázek 2: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace šestialelového mikrosatelitního lokusu SB 4. Teplota *annealingu* byla 64 °C a čas elektroforetické separace byl 120 minut. Čísla 1–16 označují kultivary: 1 - 'Sudaruška', 2 - 'Friesdorfer Orange', 3 - 'Voroběvská', 4 - 'Bohatýr', 5 - 'Elizaveta', 6 - 'Tenga', 7 - 'Červená Pochodeň', 8 - 'Dorana', 9 - 'Čujská', 10 - 'Askola', 11 - 'Sandora', 12 - 'Inja', 13 - 'Eva', 14 - 'Pantělejevská', 15 - 'Ljubimaja', 16 - SAD jih (samice). Čísla I–VI označují alely.



Obrázek 3: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace pětialelového mikrosatelitního lokusu SB 10. Teplota *annealingu* byla 64 °C a čas elektroforetické separace byl 120 minut. Čísla 1–7 označují kultivary: 1 - 'Friesdorfer Orange', 2 - 'Voroběvská', 3 - 'Bohatýr', 4 - 'Elizaveta', 5 - 'Tenga', 6 - 'Červená Pochodeň', 7 - 'Dorana'. Čísla I–V označují alely.



Obrázek 4: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace čtyřalelového mikrosatelitního lokusu SB 13. Teplota *annealingu* byla 64 °C a čas elektroforetické separace byl 90 minut. Čísla 1–10 označují kultivary: 1 - 'Pollmix', 2 - 'Frugana', 3 - 'Tarmo', 4 - 'Altajská', 5 - 'Podruga', 6 - 'Botanika', 7 - 'Habego', 8 - 'Ananasná', 9 - 'Sluníčko', 10 - 'Nela'. Čísla I–IV označují alely.

6 Diskuze

V praktické části této diplomové práce jsem se věnovala analýze a charakteristice mikrosatelitů, které by byly vhodné pro identifikaci kultivarů rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*), které se běžně pěstují a prodávají v rámci České republiky. Celkově jsem otestovala 22 mikrosatelitních lokusů, které jsem vyhodnotila jako polymorfní v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022). Na DNA 46 potencionálně geneticky odlišných kultivarů rakytníku řešetlákového jsem testovala 22 párů primerů, kdy 7 párů primerů pro *H. rhamnoides* navrhli Jain *et al.* (2014), další 2 páry primerů pro *H. rhamnoides* navrhl Jain (2015) a 13 párů primerů pro *H. r. mongolica* a *H. r. sinensis* navrhli Li *et al.* (2020). Testováním těchto 22 párů primerů na 46 jedincích rakytníku řešetlákového jsem získala 18 párů primerů, které poskytly dobře hodnotitelné a polymorfní produkty. Vyřadila jsem celkem 4 mikrosatelitní lokusy, a to USSM 1, USSM 13, USSM 16 a SB 9, protože jejich PCR produkty byly špatně hodnotitelné. U 18 dobře hodnotitelných a polymorfních mikrosatelitů jsem podle potřeby upravovala podmínky PCR amplifikace (teplota *annealingu*) a délku elektroforetické separace. Těchto 18 mikrosatelitů jsem amplifikovala na DNA 32 geneticky odlišných kultivarů rakytníku řešetlákového a následně je analyzovala pomocí dvou populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

Ve své práci Jain *et al.* (2014) navrhli celkem 11 polymorfních mikrosatelitů pro rakytník řešetlákový, které charakterizovali na 18 jedincích *H. rhamnoides* přirozeně rostoucích v Indii. Rovněž provedli úspěšnou *cross-species* amplifikaci u 5 jedinců *H. salicifolia*. Z těchto 11 polymorfních mikrosatelitů jsem ve své diplomové práci použila 7 mikrosatelitů, a to konkrétně USSM 1, USSM 3, USSM 5, USSM 7, USSM 13, USSM 16 a USSM 25. Kvůli problematickému hodnocení jsem 3 mikrosatelity (USSM 1, USSM 13 a USSM 16) nepoužila k další analýze a charakterizaci. Z práce Jain *et al.* (2014) jsem pro testování na DNA 32 geneticky odlišných jedinců rakytníku řešetlákového použila 4 mikrosatelity, a to USSM 3, USSM 5, USSM 7 a USSM 25. U všech 4 mikrosatelitů jsem detekovala více alel, než detekovali Jain *et al.* (2014). Vyšší počet alel v mé práci může souviset s vyšším počtem testovaných jedinců, protože já jsem mikrosatelity testovala na 32 geneticky odlišných jedincích, zatímco Jain *et al.* (2014) je testovali pouze na 18 jedincích. Dále to může souviset s tím, že testování jedinci v mé diplomové práci jsou různými poddruhy rakytníku řešetlákového

a jejich kříženci a původně pochází z různých geografických oblastí, zatímco jedinci v práci Jain *et al.* (2014) pochází z přirozené populace v severní Indii. Srovnání výsledků Jain *et al.* (2014) s mými výsledky je shrnuto v Tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Srovnání mých výsledků testovaných na 32 geneticky odlišných jedincích s výsledky Jain *et al.* (2014) testovaných na 18 jedincích. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, mnou použitá teplota *annealingu* (T_a) a zjištěný počet alel (N) a teplota *annealingu* (T_a) a počet alel (N) uvedené v publikaci.

Mikrosatelit	Moje výsledky		Jain <i>et al.</i> (2014)	
	T_a [°C]	N	T_a [°C]	N
USSM 3	67	12	54	7
USSM 5	66	7	56	5
USSM 7	66	9	50	3
USSM 25	64	9	55	3

Ve své disertační práci Jain (2015) testoval celkem 32 mikrosatelitních markerů na 93 jedincích rakytníku řešetlákového, z toho 10 mikrosatelitů pocházelo z práce Jain *et al.* (2014). Tyto mikrosatelity testoval na jedincích rakytníku řešetlákového sesbíraných ze 2 různých geografických oblastí v Indii, a to Leh a Lahaul. Celkem 52 jedinců rakytníku řešetlákového pocházelo z oblasti Leh a 41 jedinců rakytníku řešetlákového pocházelo z oblasti Lahaul. Z disertační práce Jain (2015) jsem pro testování na DNA 32 geneticky odlišných jedinců rakytníku řešetlákového použila 6 mikrosatelitů, a to USSM 3, USSM 5, USSM 7, USSM 25, USSM 30 a USSM 50. U 3 mikrosatelitů jsem detekovala vyšší počet alel, než detekoval Jain (2015) a u mikrosatelitu USSM 5 jsem detekovala méně alel. U 2 mikrosatelitů jsem detekovala stejný počet alel, a to u USSM 30 a USSM 50, ale použila jsem jiné teploty *annealingu*, než použil Jain (2015). Srovnání počtů alel a použité teploty *annealingu* v práci Jain (2015) s mými výsledky je shrnuto v Tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Srovnání mých výsledků testovaných na 32 geneticky odlišných jedincích s výsledky Jain (2015). V tabulce je uveden název mikrosatelitu, mnou použitá teplota *annealingu* (T_a) a zjištěný počet alel (N) a teplota *annealingu* (T_a) a počet alel (N) uvedené v publikaci. Čísla v závorkách u počtu alel udávají počet testovaných jedinců.

Mikrosatelit	Moje výsledky		Jain (2015)	
	T_a [°C]	N	T_a [°C]	N
USSM 3	67	12	54	6 (52), 6 (41)
USSM 5	66	7	56	8 (52), 4 (41)
USSM 7	66	9	50	5 (52), 5 (41)
USSM 25	64	9	55	4 (52), 4 (41)
USSM 30	52	3	54	3 (52), 3 (41)
USSM 50	57	4	55	3 (52), 4 (41)

Jain (2015) rovněž ve své práci u mikrosatelitů uvedl zjištěné hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E), hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O) a polymorfni informační obsah (PIC). U sbírky 52 jedinců rakytníku řešetlákového z Lehu jsou všechny hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O) a polymorfni informační obsah (PIC) nižší, než mnou zjištěné hodnoty na 32 geneticky odlišných jedincích rakytníku řešetlákového prodáváných v České republice. Dokonce u mikrosatelitu USSM 50 Jain (2015) uvádí nulovou hodnotu pozorované heterozygotnosti (H_O), zatímco já jsem u tohoto mikrosatelitu ve své diplomové práci zjistila výrazně vyšší hodnotu H_O . U všech 6 mikrosatelitů Jain (2015) zjistil, že hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) byla vždy vyšší než hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O). Já jsem u dvou mikrosatelitů, a to u USSM 3 a USSM 7, zjistila naopak vyšší hodnotu pozorované heterozygotnosti (H_O) než hodnotu očekávané heterozygotnosti (H_E). U sbírky 41 jedinců rakytníku řešetlákového z Lahaulu jsou také všechny hodnoty polymorfniho informačního obsahu (PIC) nižší, než mnou zjištěné hodnoty na 32 geneticky odlišných jedincích rakytníku řešetlákového prodáváných v České republice. Co se týče hodnot pozorované heterozygotnosti (H_O), Jain (2015) zjistil vyšší hodnotu H_O u mikrosatelitu USSM 5, než kterou jsem u stejného mikrosatelitu zjistila já. Hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O) u zbylých 5 mikrosatelitů jsou nižší, než mnou zjištěné hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O)

na 32 geneticky odlišných jedincích. Jain (2015) také zjistil u všech 6 mikrosatelitů testovaných na jedincích z Lahaulu, že hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) byla vždy vyšší než hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O), což taková situace může vzniknout v důsledku nedostatku heterozygotů, který je přisuzován faktorům, jako je vyšší frekvence inbreedingu v populaci, nízký počet jedinců v populaci, přítomnost nulových alel nebo Wahlundův efekt (Xuan *et al.*, 2009). Srovnání genetické diverzity mikrosatelitů u rakytníků řešetlákových prodáváných v ČR a přirozeně rostoucích v indickém Himálaji je shrnuto v Tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Srovnání mých výsledků genetické diverzity pro 32 geneticky odlišných jedinců rakytníku řešetlákového s výsledky Jain (2015) za použití stejných 6 mikrosatelitů. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, očekávaná heterozygotnost (H_E), pozorovaná heterozygotnost (H_O) a polymorfní informační obsah (PIC). U výsledků Jain (2015) jsou před lomítkem výsledky pro 52 jedinců rakytníku řešetlákového z Lehu a za lomítkem jsou výsledky pro 41 jedinců rakytníku řešetlákového z Lahaulu.

Mikrosatelit	Moje výsledky			Jain (2015)		
	H_E	H_O	PIC	H_E	H_O	PIC
USSM 3	0,897	0,938	0,872	0,781/0,755	0,231/0,400	0,311/0,326
USSM 5	0,632	0,531	0,568	0,816/0,742	0,308/0,617	0,246/0,486
USSM 7	0,825	0,875	0,790	0,782/0,768	0,709/0,273	0,453/0,381
USSM 25	0,610	0,438	0,578	0,713/0,713	0,250/0,171	0,413/0,396
USSM 30	0,621	0,500	0,539	0,613/0,642	0,135/0,341	0,430/0,482
USSM 50	0,629	0,563	0,560	0,618/0,723	0,000/0,386	0,412/0,422

Nawaz *et al.* (2018) studovali genetickou diverzitu rakytníku řešetlákového rostoucího v Pákistánu. Celkem odebrali listy z 300 přirozeně rostoucích rakytníků řešetlákových na území pohoří Karákóram v severním Pákistánu. Ke genotypizaci použili 12 mikrosatelitů, z toho 3 mikrosatelity byly rovněž použity i v této diplomové práci (USSM 3, USSM 7 a USSM 25). Nawaz *et al.* (2018) u mikrosatelitu USSM 3 detekovali 7 alel, avšak já jsem detekovala 12 alel na přibližně 10x menším počtu jedinců. U mikrosatelitu USSM 7 detekovali stejný počet alel jako já (9) a u mikrosatelitu USSM 25 rovněž detekovali stejný počet alel jako já v této diplomové

práci (9). Autoři ve své práci neuvádějí teplotu *annealingu*. U mikrosatelitu USSM 3 zjistili, že hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) byla 0,704 a hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O) byla 0,729. U mikrosatelitu USSM 7 hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) byla 0,786 a hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O) byla 0,867. U mikrosatelitu USSM 25 hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) byla 0,676 a hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O) byla 0,653. Mnou zjištěná hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) u mikrosatelitu USSM 3 byla 0,897 a hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O) byla 0,938. U mikrosatelitu USSM 7 jsem zjistila, že očekávané heterozygotnosti (H_E) byla 0,825 a hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O) byla 0,875 a u mikrosatelitu USSM 25 byla hodnota očekávané heterozygotnosti (H_E) 0,610 a hodnota pozorované heterozygotnosti (H_O) byla 0,438. Nawaz *et al.* (2018) stejně jako já zjistili, že u mikrosatelitů USSM 3 a USSM 7 převyšovala úroveň pozorované heterozygotnosti (H_O) nad očekávanou heterozygotností (H_E).

Li *et al.* (2020) navrhli 23 polymorfních mikrosatelitů, které testovali na 78 jedincích rakytníku řešetlákového rostoucích v severní Číně, kdy 52 jedinců bylo *H. r. mongolica*, 6 jedinců bylo *H. r. sinensis* a 20 jedinců byli hybridí zmíněných dvou poddruhů. Z těchto 23 polymorfních mikrosatelitů jsem ve své diplomové práci použila 13 mikrosatelitů, a to konkrétně SB 2, SB 3, SB 4, SB 7, SB 8, SB 9, SB 10, SB 11, SB 13, SB 14, SB 18, SB 20, SB 22. Pro další analýzu a charakterizaci jsem kvůli problematickému hodnocení vyřadila mikrosatelit SB 9. U 8 mikrosatelitů jsem detekovala vyšší počet alel, než detekovali Li *et al.* (2020) a u mikrosatelitů SB 2 a SB 8 jsem detekovala menší počet alel. U 2 mikrosatelitů jsem detekovala stejný počet alel, a to u SB 7 a SB 13, avšak jsem použila jiné teploty *annealingu*, než použili Li *et al.* (2020). Srovnání výsledků Li *et al.* (2020) s mými výsledky je shrnuto v Tabulce č. 14.

Tabulka č. 14: Srovnání mých výsledků testovaných na 32 geneticky odlišných jedincích s výsledky Li *et al.* (2020) testovaných na 78 jedincích. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, mnou použitá teplota *annealingu* (T_a) a zjištěný počet alel (N) a teplota *annealingu* (T_a) a počet alel (N) uvedené v publikaci.

Mikrosatelit	Moje výsledky		Li <i>et al.</i> (2020)	
	T_a [°C]	N	T_a [°C]	N
SB 2	66	3	56	4
SB 3	65	8	60	4
SB 4	64	6	54	2
SB 7	64	2	56	2
SB 8	66	4	60	5
SB 10	64	5	60	3
SB 11	54	3	58	2
SB 13	64	4	60	4
SB 14	63	4	60	2
SB 18	60	6	55	2
SB 20	55	12	58	2
SB 22	63	4	59	3

Li *et al.* (2020) ve své práci dále uvádějí hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E), hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O) a polymorfní informační obsah (PIC). Celkem u 10 z 12 mikrosatelitů jsem zjistila vyšší hodnotu pozorované heterozygotnosti (H_O), než zjistili Li *et al.* (2020). U mikrosatelitu SB 10 autoři zjistili nepatrně vyšší hodnotu pozorované heterozygotnosti (H_O), než jakou jsem u stejného mikrosatelitu zjistila já. Dále u mikrosatelitu SB 13 zjistili autoři vyšší hodnotu pozorované heterozygotnosti (H_O), než jakou jsem u stejného mikrosatelitu zjistila já. Co se týče polymorfního informačního obsahu (PIC), zjistila jsem u všech 12 mikrosatelitů vyšší hodnotu, než kterou zjistili Li *et al.* (2020). Pozorovaná heterozygotnost (H_O) převyšovala úroveň očekávané heterozygotnosti (H_E) v práci Li *et al.* (2020) celkem u 5 mikrosatelitů, a to u SB 2, SB 7, SB 18, SB 20 a SB 22. V mé práci tomu tak bylo u 3 mikrosatelitů, a to u SB 11, SB 20 a SB 22. Srovnání genetické diverzity kultivarů rakytníku řešetlákového prodáváných v ČR a čínských kultivarů sesbíraných v severní Číně je shrnuto v Tabulce č. 15.

Tabulka č. 15: Srovnání mých výsledků genetické diverzity pro 32 geneticky odlišných jedinců rakytníku řešetlákového s výsledky Li *et al.* (2020) pro 78 jedinců rakytníku řešetlákového rostoucích v severní Číně, za použití stejných 12 mikrosatelitů. V tabulce je uveden název mikrosatelitu, očekávaná heterozygotnost (H_E), pozorovaná heterozygotnost (H_O) a polymorfní informační obsah (PIC).

Mikrosatelit	Moje výsledky			Li <i>et al.</i> (2020)		
	H_E	H_O	PIC	H_E	H_O	PIC
SB 2	0,201	0,156	0,183	0,121	0,128	0,117
SB 3	0,828	0,813	0,790	0,553	0,462	0,463
SB 4	0,669	0,531	0,615	0,334	0,269	0,278
SB 7	0,507	0,406	0,375	0,074	0,077	0,071
SB 8	0,705	0,625	0,632	0,649	0,385	0,582
SB 10	0,522	0,250	0,482	0,349	0,295	0,311
SB 11	0,466	0,594	0,411	0,482	0,167	0,366
SB 13	0,593	0,313	0,496	0,538	0,423	0,439
SB 14	0,740	0,688	0,677	0,499	0,307	0,375
SB 18	0,629	0,469	0,550	0,038	0,039	0,037
SB 20	0,847	0,906	0,816	0,153	0,167	0,141
SB 22	0,552	0,563	0,491	0,225	0,256	0,203

Laboratoř populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL se kromě mikrosatelitové identifikace kultivarů rakytníku řešetlákového zabývá také identifikací kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*). Pro kultivary rakytníku řešetlákového zatím neexistuje žádný systém k identifikaci či mezinárodní databáze, což ztěžuje vyhodnocení získaných dat. Pro brusnici chocholičnatou existuje hned několik systémů k identifikaci jejích odrůd. Boches (2005) navrhl 9 mikrosatelitních markerů pro určení genotypů kultivarů brusnice chocholičnaté. Hinrichsen *et al.* (2008) popsali 12 mikrosatelitních markerů pro identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté a systém od Akagi *et al.* (2010) obsahuje 11 mikrosatelitních markerů. V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL pro mikrosatelitovou identifikaci kultivarů brusnice chocholičnaté byly použity 2 mikrosatelitní systémy, a to Boches (2005) a Akagi *et al.* (2010) (Balažíková, 2023). Balažíková (2023) ve své diplomové práci testovala 7 párů primerů na DNA 53

rostlin, kdy se mělo jednat o 32 různých kultivarů brusnice chocholičnaté. Pouze 22 rostlin mělo shodný název kultivaru s jeho genetickým profilem. Balážiková (2023) dokázala, že rozsáhlý počet kultivarů brusnice chocholičnaté je v rámci České republiky prodáván pod špatným pojmenováním. Oproti tomu jsem já ve své diplomové práci použila 18 párů primerů na DNA 46 kultivarů rakytníku řešetlákového, kdy se mělo jednat o 43 různých kultivarů a 3 rostliny bez kultivarového určení. Analýzou 18 mikrosatelitů jsem zjistila několik špatných kultivarových určení rakytníku řešetlákového. Konkrétně se jednalo o 2 trojice, 1 pětiici a 6 dvojic kultivarů, které byly geneticky totožné nebo se lišily pouze jedním mikrosatelitem a jedná se tedy zřejmě o stejný genetický materiál. Rovněž i já jsem prokázala, že velké množství kultivarů rakytníku řešetlákového je v České republice prodáváno pod nesprávnými názvy. K těmto záměnám pojmenování kultivarů může docházet například u prodejců při distribuci nebo skladování, kdy může dojít k prohození štítků s názvem daného kultivaru. Dále k záměně může nastat přímo u pěstitelů, kdy může dojít k prohození vzorků kultivarů. Někteří pěstitelé používají techniku explantátových kultur a může se stát, že při založení kultury použijí chybně určený rostlinný materiál. Otázkou je, jaká je situace s dalšími druhy rostlin, kde se jednotlivé kultivary morfologicky podobají. Prodávání kultivarů pod špatnými názvy, jako je tomu u rakytníku řešetlákového a brusnice chocholičnaté, může být například dále u třešní, angreštů, rybízů, ořechů apod.

Tato diplomová práce je první prací, která se zabývá hledáním vysoce polymorfních a dobře hodnotitelných mikrosatelitů, které by bylo možné použít pro identifikaci kultivarů rakytníku řešetlákového, které jsou pěstovány na území České republiky. Celkově jsem otestovala 22 párů primerů, které jsem vybrala ze své bakalářské práce (Grygarová, 2022). V mé bakalářské práci je dalších 14 polymorfních mikrosatelitů, které nebyly testovány na větším množství kultivarů rakytníku řešetlákového. Dále je navrženo pro rakytník řešetlákový dalších 118 mikrosatelitních markerů, které zatím nebyly testovány na kultivarech prodáváných v ČR (Jain *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Jain, 2015; Islam *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017a; Li *et al.*, 2017b; Wang *et al.*, 2021b). Rovněž je navrženo 8 mikrosatelitních markerů pro rakytník tibetský (Qiong *et al.*, 2017), které by mohly být použity pro *cross-species* amplifikaci. Také pro *cross-species* amplifikaci by mohlo být použito 11 mikrosatelitů, které byly navrženy pro hlošinu úzkolistou (Gaskin *et al.*, 2013) a 20 mikrosatelitů, které byly navrženy pro *Elaeagnus mollis* (Ye *et al.*, 2016). Testování dalších mikrosatelitních

lokusů může přinést nové unikátní genotypy, či pomoci od sebe geneticky rozlišit kultivary, které měly shodné genetické profily. Dále v této diplomové práci nebyly testovány všechny kultivary rakytníku řešetlákového, které se prodávají v České republice. Při testování na větším množství kultivarů se může stát, že markerový genotyp konkrétního mikrosatelitu už nebude unikátním a bude sdílen s dalším kultivarem.

Kultivary rakytníku řešetlákového lze v některých případech od sebe odlišit pomocí morfologických znaků jako je například velikost, barva a tvar plodů, ale většinou je obtížné je správně identifikovat pouze na základě morfologie. Také se může stát, že jednotlivé rostliny stejného kultivaru se budou navzájem lišit, pokud jsou pěstovány v různých podmínkách. Navíc se kultivary rakytníku řešetlákového množí vegetativně, a proto se předpokládá, že budou tvořeny jediným genotypem, který je možno identifikovat a rozlišit jej od ostatních kultivarů. Do budoucna je zapotřebí vytvořit jednotný systém pro identifikaci kultivarů rakytníku řešetlákového pěstovaných v ČR, který by obsahoval genotypy jednotlivých kultivarů.

7 Závěr

V rámci této diplomové práce jsem pomocí PCR amplifikace u 46 potencionálně geneticky odlišných kultivarů rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*) otestovala 22 párů primerů. Mikrosatelity, které jsem zde použila pro amplifikaci, jsem již předtím určila jako polymorfní v mé bakalářské práci (Grygarová, 2022) testováním na 6 geneticky odlišných rostlinách rakytníku řešetlákového. Tyto mikrosatelity byly navrženy pro asijské poddruhy rakytníku řešetlákového. Mým cílem bylo najít vysoce polymorfní a dobře hodnotitelné mikrosatelity, které by bylo možné použít pro identifikaci kultivarů rakytníku řešetlákového, které jsou komerčně dostupné na území České republiky.

Z celkově testovaných 22 párů primerů jich 18 poskytlo polymorfní a dobře hodnotitelný PCR produkt. Celkem 4 páry primerů jsem vyřadila (USSM 1, USSM 13, USSM 16 a SB 9), protože neposkytly dobře hodnotitelné produkty, a tedy se nehodí pro mikrosatelitovou identifikaci kultivarů rakytníku řešetlákového.

U všech 18 polymorfních a dobře hodnotitelných mikrosatelitů jsem určila počet alel a genotypů a dále jsem pomocí programů Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5 určila jejich charakteristiku a otestovala vazbu mezi lokusy. Počet alel se pohyboval od 2 do 12 a počet genotypů se pohyboval od 3 do 20 na lokus. Celkem 30 dvojic ze 153 dvojic mikrosatelitních lokusů je v silné vazbě, což je pochopitelné vzhledem k vzájemnému příbuzenství mnoha jedinců.

Genotypizací 46 jedinců jsem našla pouze 32 unikátních genotypů. Zjistila jsem, že 2 trojice, 1 pětice a 6 dvojic kultivarů byly geneticky totožné, a tedy muselo dojít k chybnému určení kultivaru buď u prodejců nebo přímo u pěstitelů.

Pro rostliny z čeledi hlošínovitých (Elaeagnaceae) bylo doteď popsáno ještě dalších 171 mikrosatelitů, které by do budoucna bylo vhodné otestovat a charakterizovat a mohly by být dalšími cennými nástroji pro určování genetické unikátnosti či odrůdové příslušnosti rostlin rakytníku řešetlákového.

8 Použitá literatura

- Abartene, D.Y., Malakhovskis, A.I. (1975): Combined action of a cytostatic preparation and sea buckthorn oil on the growth of sarcoma m 1 in rats and their hematological and biochemical indices. Lietuvos TSR Mokslu Akademijos Darbai Serija C Biologijos Mokslai, 1: 167–171.
- Ainsworth, C. (2000): Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. Annals of Botany, 86: 211–221.
- Akagi I., Kunitake H., Osada R., Sugita W., Utoyama H., Hirahara T. (2010): Method for discriminating blueberry cultivar. Patent. Přihl.: 16. 10. 2008. Uděl.: 30. 4. 2010. JP2010094070A.
- Andersson, S.C., Olsson, M.E., Johansson, E., Rumpunen, K. (2009): Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin A, as a Maturity Marker. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 250–258.
- Bailey, L.H., Bailey, E.Z. (1978): Hortus Third: A concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. Macmillan Publishers.
- Baite, M.S., Upadhyay, B.K., Dubey, S.C. (2020): Development of a sequence-characterized amplified region marker for detection of *Ascochyta rabiei* causing Ascochyta blight in chickpea. Folia Microbiologica, 65: 103–108.
- Bajer, J. (2014): Rakytník: zázračná rostlina, oranžový poklad. Mladá fronta, Praha.
- Baker, R.M. (1996): The future of the invasion shrub, sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) on the west coast of Britain. Aspects Of Applied Biology, 44: 461–468.
- Balažiková, M. (2023): Mikrosatelitová identifikace vybraných kultivarů brusnice chocholičnaté (*Vaccinium corymbosum*). Diplomová práce. PřF UPOL, Olomouc.
- Barreneche, T., Carcamo de la Concepcion, M., Blouin-Delmas, M., Ordidge, M., Nybom, H., Laciš, G., Feldmane, D., Sedlák, J., Meland, M., Kaldmäe, H., Kahu, K., Békefi, Z., Stanivuković, S., Đurić, G., Höfer, M., Galik, M., Schüller, E., Spornberger, A., Sirbu, S., Drogoudi, P., Agulheiro-Santos, A.C., Kodad, O., Vokurka, A., Lateur, M., Fernández, F.F., Giovannini, D., Quero-García, J. (2021): SSR-based analysis of genetic diversity and structure of sweet cherry (*Prunus avium* L.) from 19 countries in Europe. Plants, 10: 1983.

- Bartish, I.V., Jeppsson, N., Bartish, G.I., Lu, R., Nybom, H. (2000): Inter- and intraspecific genetic variation in *Hippophae* (Elaeagnaceae) investigated by RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 225: 85–101.
- Bartish, I.V., Jeppsson, N., Nybom, H. (1999): Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*, 8: 791–802.
- Bartish, I.V., Jeppsson, N., Swenson, U., Nybom, H. (2002): Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology. *Systematic Botany*, 27: 41–54.
- Bernath, J., Foldesi D. (1992): Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A promising new medicinal and food crop. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 1: 27–35.
- Beveridge, T., Harrison, J.E., Drover, J. (2002): Processing effects on the composition of sea buckthorn juice from *Hippophae rhamnoides* L. cv. Indian Summer. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 113–116.
- Biswas, M.R., Biswas, A.K. (1980): In desertification, control the deserts and create pastures. *Environmental Science Applications*, 12 : 145–162.
- Boches P. (2005): Microsatellite marker development and molecular characterization in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and *Vaccinium* species. Disertační práce. Oregon State University.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314–331.
- Bryan, G.J., McNicoll, J., Ramsay, G., Meyer, R.C., De Jong, W.S. (1999): Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 859–867.
- Buhatel, T., Vesa, S., Morar, R. (1991): Data on the action of sea buckthorn oil extract in the cicatrization of wounds in animals. *Buletinul Institutului Agronomic Cluj-Napoca Seria Zootehnie si Medicina Veterinara*, 45: 129–133.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142: 169–196.

- Dai, Y.R., Gao, C.M., Tian, Q.L., Yin, Y. (1987): Effect of extracts of some medicinal plants on superoxide dismutase activity in mice. *Planta Medica*, 53: 309–310.
- Eliseev, I.P., Fefelov, V.A. (1977): Material for studying *Hippophae rhamnoides* in Kabardino-Balkaria. *Trudy Gorkovskogo Selskokhozyaistvennogo Instituta*, 105: 3–7.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435–445.
- Falconer, D.S., Mackay, T. (1996): *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Scientific Technical, New York.
- Gaskin, J.F., Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M. (2013): Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*; Elaeagnaceae). *Applications in Plant Sciences*, 1: 1300013.
- Gatner, E.M.S., Gardner I.C. (1970): Observations on the fine structures of the root nodule endophyte of *Hippophae rhamnoides* L. *Archives of Microbiology*, 70: 183–196.
- Ghangal, R., Chaudhary, S., Jain, M., Purty, R.S., Sharma, P.C. (2013): Optimization of de novo short read assembly of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *PLoS One*, 8: e72516.
- Gillespie, J.H. (1998): *Population Genetics - A Concise Guide*. John Hopkins University Press, Baltimore, MD/London.
- Godwin, I.D., Aitken, E.A.B., Smith, L.W. (1997): Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18: 1524–1528.
- Grygarová, Š. (2022): Genetické markery pro studium vnitrodruhové variability rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. J. (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591–611.
- Gupta, P.K., Roy, J.K., Prasad, M. (2001): Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, 80: 524–535.
- Gutzeit, D., Baleanu, G., Winterhalter, P., Jerz, G. (2008): Vitamin C Content in Sea Buckthorn Berries (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) and Related

- Products A Kinetic Study on Storage Stability and the Determination of Processing Effects. *Journal of Food Science*, 2008: 9.
- Hinrichsen P., Castro M.H., Ravest G., Rojas G., Méndez M.A., Bassil N., Schick C.E.M. (2008): Minimal microsatellite marker panel for fingerprinting blueberry cultivars. *Acta Horticulturae*, 810: 173–180.
- Hodel, R.G., Segovia-Salcedo, M.C., Landis, J.B., Crowl, A.A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M.A., Douglas, N.A., Germain-Aubrey, C.C., Chen, S., Soltis, D.E., Soltis, P. S. (2016): The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences*, 4: 1600025.
- Charlesworth, D. (2002): Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity*, 88: 94–101.
- Chaudhary, S., Sharma, P.C. (2022): Genetic diversity and population structure in wild seabuckthorn (*Hippophae salicifolia* D. Don) growing in the Uttarakhand region of the Indian Himalayas. *Genetic Resources and Crop Evolution*, DOI: 10.1007/s10722-022-01427-1.
- Chawla, A., Stobdan, T., Srivastava, R.B., Jaiswal, V., Chauhan, R.S., Kant, A. (2015): Sex-biased temporal gene expression in male and female floral buds of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *PLoS ONE*, 10: e0124890.
- Chen, J.H. (1991): Effect of the immunomodulating agents (BCG) and the juice of HRL on the activity of splenic NK cells and LAK cells from tumour bearing mice. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 11: 105–108.
- Cheng, T., Li, T., Duan, Z., Cao, Z., Ma, Z., Zhang, P. (1990): Acute toxicity of flesh oil of *Hippophae rhamnoides* L. and its protection against experimental hepatic injury. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 15: 45–47.
- Cheng, Y.J., Meng, H.J., Guo, W.W., Deng, X.X. (2006): Universal chloroplast primer pairs for simple sequence repeat analysis in diverse genera of fruit crops. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81: 132–138.
- Islam, A., Sinha, P., Sharma, S.S., Negi, M.S., Tripathi, S.B. (2015): Isolation and Characterization of Novel Polymorphic Microsatellite Loci in *Hippophae rhamnoides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*.
- Jain, A. (2015): Analysis of microsatellite polymorphism in relation to geographical distribution and adaption of seabuckthorn in India. *Disertační práce*. University

school of biotechnology, Guru Gobind Singh Indraprastha University, Sector-16C, Dwarka, New Delhi-110078.

- Jain, A., Ghangal, R., Grover, A., Raghuvanshi, S., Sharma, P.C. (2010): Development of EST-based new SSR markers in seabuckthorn. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16: 375–378.
- Jain, A., Chaudhary, S., Sharma, P.C. (2014): Mining of microsatellites using next generation sequencing of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 115–123.
- Jain, A., Sharma, P.C. (2022): Morphometric and Microsatellite Diversity in Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Natural Populations Originating from the Different Geographical Regions of the Indian Himalayas. *Plant Molecular Biology Reporter*, 40: 566–578.
- Jang, I., Moon, J.H., Yoon, J.B., Yoo, J.H., Yang, T.J., Kim, Y.J., Park, H.G. (2004): Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of F1 hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*). *Molecules and Cells*, 18: 295–299.
- Jasra, A.W. (1998): Seabuckthorn: A Medicinal Plant for High Arid-Regions. Asia Pacific Mountain Network. National Aridland Development and Research Institute (NADRI), Pakistan, 3.
- Jiang, G. (2013): Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. In: Andersen, S.B. (ed.), *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, IntechOpen, London.
- Joshi, S., Ranjekar, P., Gupta, V. (1999): Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, 77: 230–240.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309–334.
- Kalinowski, S., Taper, M., Marshall, T. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases succes in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.
- Kallio, H., Yang, B., Peippo, P., Tahvonen, R., Pan, R. (2002): Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*), *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 50: 3004–3009.

- Kluczynski, B. (1989): Effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivation on post-industrial wastelands in Poland. Proceedings of the First International Symposium on Sea Buckthorn, Xi'an, China: 275–287.
- Kondrashov, V.T., Sokolova, E.P. (1990): New wilt-resistant forms of *Hippophae rhamnoides*. Byulleten Moskovskogo Obshchestva Ispytatelei Prirody Biologicheskii, 96: 146–153.
- Korekar, G., Sharma, R.K., Kumar, R., Meenu, Bisht, N.C.; Srivastava, R.B., Ahuja, P.S., Stobdan, T. (2012): Identification and validation of sex-linked SCAR markers in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae). Biotechnology Letters, 34: 973–978.
- Kukenov, M.K., Dzhumagalieva, F.D., Tatimova, N.G., Bespaev, S.B. (1982): Study of medicinal plant reserves and distribution atlas compilation in the Kazakh-SSR USSR and prospects of their use in public health service. Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi Seriya Biologicheskaya, 1: 3–6.
- Lācis, G., Kota-Dombrovska, I. (2014): Assessment of genetic diversity of Latvian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) germplasm using molecular markers. Zemdirbyste-Agriculture, 101: 333–340.
- Li, H., Ruan, C., Ding, J., Li, J., Wang, L., Tian, X. (2020): Diversity in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) accessions with different origins based on morphological characteristics, oil traits, and microsatellite markers. PLoS ONE, 15: e0230356.
- Li, H., Ruan, C.J., Wang, L., Ding, J., Tian, X. (2017a): Development of RNA-Seq SSR Markers and Application to Genetic Relationship Analysis among Sea Buckthorn Germplasm. Journal of the American Society for Horticultural Science, 142: 200–208.
- Li, S.S., Zeng, Y.F., He, C.Y., Zhang, J.G. (2017b): Development of EST-SSR markers based on sea buckthorn transcriptomic sequences. Forest Research, 30: 69–74.
- Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J., Oomah B.D. (2003): Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): production and utilization. The National Research Council (NRC) Research Press, Ottawa, ISBN 0-660-19007-9.
- Li, T.S.C., Schroeder, W.R. (1996): Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*): A Multipurpose Plant, Horticultural Technology. 6: 370–378.

- Li, Y. C., Korol, A.B., Tzion, F., Avigdor, B., Eviatar, N. (2002): Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology*, 11: 2453–2465.
- Lian, Y. (1988): New discoveries of the genus *Hippophae* L. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 26: 235–237.
- Liu, Z., Moore, P.H., Ma, H., Ackerman, C.M., Ragiba, M., Yu, Q., Pearl, H.M., Kim, M.S., Charlton, J.W., Stiles, J.I., Zee, F.T., Paterson, A.H., Ming, R. (2004): A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature*, 427: 348–352.
- Lu, R. (1992): Sea buckthorn: A multipurpose plant species for fragile mountains. International Center for Integrated Mountain Development (ICIMOD). Occasional Paper No. 20. Katmandu, Nepal.
- Luo, X., Liu, J., & He, Z. (2022): Oligo-FISH Can Identify Chromosomes and Distinguish *Hippophaë rhamnoides* L. *Taxa. Genes*, 13: 195.
- Mangla, Y., Das, K., Bali, S., Ambreen, H., Raina, S.N., Tandon, R., Goel, S. (2019): Occurrence of subdioecy and scarcity of gender-specific markers reveal an ongoing transition to dioecy in Himalayan seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*). *Heredity*, 122: 120–132.
- Matsunaga, S., Kawano, S. (2001): Sex determination by sex chromosome in dioecious plants. *Plant Biology*, 3: 481–488.
- Mendelová, A., Mendel, L., Czako, P., Mareček, J. (2016): Evaluation of Carotenoids, Polyphenols Content and Antioxidant Activity in the Sea Buckthorn Fruit. *Potravinárstvo*, 10: 59–64.
- Muranty, H., Denancé, C., Feugey, L., Crépin, J.-L., Barbier, Y., Tartarini, S., Ordidge, M., Troglio, M., Lateur, M., Nybom, H., Paprstein, F., Laurus, F., Durel, Ch.-E. (2020): Using whole-genome SNP data to reconstruct a large multi-generation pedigree in apple germplasm. *BMC Plant Biology*, 20: 2.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F.S. (2017): DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32: 261–285.
- Nawaz, M.A., Krutovsky, K.V., Mueller, M., Gailing, O., Khan, A.A., Buerkert, A., Wiehle, M. (2018): Morphological and Genetic Diversity of Sea Buckthorn

- (*Hippophae rhamnoides* L.) in the Karakoram Mountains of Northern Pakistan. *Diversity*, 10: 76.
- Nei M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 3321–3323.
- Nybom, H. (2004): Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143–1155.
- Nybom, H., Ruan, C., Rumpunen, K. (2023): The Systematics, Reproductive Biology, Biochemistry, and Breeding of Sea Buckthorn—A Review. *Genes*, 14: 2120.
- Paterson, A.H. (1996): Making genetic maps. In: Paterson, A.H. (ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 23–39, RG Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.
- Persson, H.A., Nybom, H. (1998): Genetic sex determination and RAPD marker segregation in the dioecious species sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Hereditas*, 129: 45–51.
- Puterova, J., Razumova, O., Martinek, T., Alexandrov, O., Divashuk, M., Kubat, Z., Hobza, R., Karlov, G., Kejnovsky, E. (2017): Satellite DNA and Transposable Elements in Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*), a Dioecious Plant with Small Y and Large X Chromosomes. *Genome Biology and Evolution*, 9: 197–212.
- Qiong, L., Zhang, W., Wang, H., Zeng, L., Birks, H.J.B., Zhong, Y. (2017): Testing the effect of the Himalayan mountains as a physical barrier to gene flow in *Hippophae tibetana* Schlect. (Elaeagnaceae). *PLoS ONE* 12: e0172948.
- Raffo, S., Paoletti, F., Antonelli, M. (2004): Changes in Sugar, Organic Acid, Flavonol and Carotenoid Composition during Ripening of Berries of Three Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Cultivars. *European Food Research and Technology*, 219: 360–368.
- Ramel C. (1997): Mini- and microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105: 781–789.
- Ritland, K. (1996): Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, 67: 175–185.
- Rosch, D. (2004): Structure-Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Seabuckthorn Juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51: 4233–4239.

- Rousi, A. (1971): The genus *Hippophae* L. A taxonomic study. *Annales Botanici Fennici*, 8: 177–227.
- Rousi, A., Arohonka, T. (1980): C-band and ploidy level of *Hippophae rhamnoides*. *Hereditas*, 92: 327–330.
- Ruan, C.J., Nybom, H., Rumpunen, K. (2013): Advances in improvement of quality and resistance in a multipurpose crop: Sea buckthorn. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33: 126–144.
- Sharma, A., Zinta, G., Rana, S., Shirko, P. (2010): Molecular identification of sex in *Hippophae rhamnoides* L. using isozyme and RAPD markers. *Forestry Studies in China*, 12: 62–66.
- Shen, S.H., Chai, X.T., Zhou, Q., Luo, D., Wang, Y.R., Liu, Z.P. (2019): Development of polymorphic EST-SSR markers and characterization of the autotetraploid genome of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *PeerJ*, 7: e6542.
- Shchapov, N.S. (1979): On the karyology of *Hippophae rhamnoides* L. *TSitologiya i Genetika*, 13: 45–47.
- Singh, V., Moersel, T. (2005): Development and commercialization of seabuckthorn: a German experience. In: Singh, V. (ed.), *Seabuckthorn (Hippophae L.): A multipurpose wonder plant*, vol. 2. Daya Publishing House, New Delhi, India, 576–584.
- Small, E., Catling, P.M., Li, T.S.C. (2000): *Blossoming Treasures of Biodiversity: Seabuckthorn – An Ancient Crop with Modern Virtues*. Eastern Cereal and Oilseed Research Centre. Agriculture and Agri-Foods, Ottawa, Canada.
- Srihari, J.V., Bhawna, V., Kumar, N., Chahota, R.K., Singh, V., Rathour, R., Singh, S.K., Sharma, S.K., Sharma, T.R. (2013): Analysis of molecular genetic diversity and population structure in sea buckthorn (*Hippophae* spp. L.) from north-western Himalayan region of India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 3183–3196.
- Sun, K., Chen, W., Ma, R., Chen, X., Li, A., & Ge, S. (2006): Genetic variation in *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae) revealed by RAPD markers. *Biochemical Genetics*, 44: 186–197.
- Synge, P.M. (1974): *Dictionary of gardening: a practical and scientific encyclopaedia of horticulture*. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford: 2316 p.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463–6471.

- Tian, C., Lei, Y., Shi, S., Nan, P., Chen, J., Zhong, Y. (2004a): Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers. *New Forests*, 27: 229–237.
- Tian, C., Nan, P., Shi, S., Chen, J., Zhong, Y. (2004b): Molecular genetic variation in Chinese populations of three subspecies of *Hippophae rhamnoides*. *Biochemical Genetics*, 42: 259–267.
- Tiitinen, K.M., Hakala, M.A., Kallio H.P. (2005): Quality components of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 1692–1699.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967–981.
- Valíček, P., Havelka E.V. (2008): Rakytník řešetlákový: rostlina budoucnosti. Start, Benešov.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.
- Wakeley, J., Nielsen, R., Liu-Cordero, S.N., Ardlie, K. (2001): The discovery of single-nucleotide polymorphisms—and inferences about human demographic history. *American Journal of Human Genetics*, 69: 1332–1347.
- Wang, A., Zhang, Q., Wan, D., Yang, Y., Liu, J. (2008): Nine microsatellite DNA primers for *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae). *Conservation Genetics*, 9: 969–971.
- Wang, L.Y., Li, S.S., Wang, T.Y., He, C.Y., Luo, H.M., Zhang, J.G., Zeng, Y.F. (2021b): Genomic SSR and EST-SSR markers for phylogenetic and pedigree construction—A comparison in sea buckthorn. *Plant Breeding*, 140: 167–183.
- Wang, T.Y., Xu, Y., Wang, L.Y., Zhang, J.G., Zeng, Y.F. (2021a): Genetic differentiation and genetic diversity of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*. *Forest Research*, 34: 13–21.
- Wang, Y., Jiang, H., Peng, S., Korpelainen, H. (2011): Genetic structure in fragmented populations of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* in China investigated by ISSR and cpSSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 295: 97–107.

- Weber J. L., May P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* 44: 388–396.
- Weising, K., Gardner, R.C. (1999): A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9–19.
- Westergaard M. (1958): The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Advances in Genetics*, 9: 217–281.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
- Winter, P., Kahl, G. (1995): Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 438–448.
- Wu, J., Cai, C.F., Cheng, F.Y., Cui, H.L., Zhou, H. (2014): Characterisation and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences. *Molecular Breeding*, 34: 1853–1866.
- Wu, Z., Chen, H., Pan, Y., Feng, H., Fang, D., Yang, J., Wang, Y., Yang, J., Sahu, S.K., Liu, J., Xing, Y., Wang, X., Liu, M., Luo, X., Gao, P., Li, L., Liu, Z., Yang, H., Liu, X., Xu, X., Liu, H. and Wang, E. (2022): Genome of *Hippophae rhamnoides* provides insights into a conserved molecular mechanism in actinorhizal and rhizobial symbioses. *New Phytologist*, 235: 276–291.
- Xu, Y. (2010): *Molecular plant breeding*. CAB International, Wallingford, Oxfordshire.
- Xuan, W.J., Zhang, Y.Y., Liu, N.N., Zhao, J.L., Jiang, G.F. (2009): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the bamboo locust *Rammeacris kiangsu* (Orthoptera: Acrididae). *European Journal of Entomology*, 106: 663–665.
- Yang, L., Khan, M.A., Mei, Z., Yang, M., Zhang, T., Wei, C., Yang, W., Zhu, L., Long, Y., Fu, J. (2014): Development of RAPD-SCAR markers for *Lonicera japonica* Thunb. (Caprifoliaceae) variety authentication by improved RAPD and DNA cloning. *Revista De Biología Tropical*, 62: 1649–1657.
- Yao Y., Tigerstedt P.M.A. (1993): Isozyme studies of genetic diversity and evolution in *Hippophae*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40: 153–164.
- Yao, Z., Qin, D., Chen, D., Liu, C., Chen, W., Liu, T., Liu, B., Li, G. (2019): Development of ISSR-derived SCAR Marker and SYBR Green I Real-time PCR

- Method for Detection of Teliospores of *Tilletia laevis* Kühn. Scientific Reports, 9: 17651.
- Ye, Z., Wang, Z., Li, Y., Rao, G., Zhang, J. (2016): Development and Characterization of Microsatellite Markers in the *Elaeagnus mollis* Diels. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 36: 274–279.
- Yushipitsina, G.G., Chuprova, N.A., Repyakh, S.M. (1988): Fractionation and Amino Acid Compositon of Proteins of the Woody Verdure of Sea Buckthorn. Chemistry of Natural Compounds, 24: 348–350.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, 11: 1–16.
- Zhao, C., Chen, G., Wang, Y., Korpelainen, H., Li, C. (2007): Genetic variation of *Hippophae rhamnoides* populations at different altitudes in the Wolong Nature Reserve based on RAPDs. Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 13: 753–758.
- Zheng, J., Yang, B., Trépanier, M., Kallio, H. (2012): Effects of Genotype, Latitude, and Weather Conditions on the Composition of Sugars, Sugar Alcohols, Fruit Acids, and Ascorbic Acid in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *mongolica*) Berry Juice. Journal of Agricultural Food Chemistry, 60: 3180–3189.
- Zhou, C.P., He, X.D., Li, F.G., Weng, G.J., Yu, X.L., Wang, Y., Li, M., Shi, J.S., Gan, S.M. (2014): Development of 240 novel EST-SSRs in Eucalyptus L'Hérit. Molecular Breeding, 33: 221–225.
- Zhou, W., Wang, Y., Zhang, G., Luan, G., Chen, S., Meng, J., Wang, H., Hu, N., & Suo, Y. (2018): Molecular Sex Identification in Dioecious *Hippophae rhamnoides* L. via RAPD and SCAR Markers. Molecules, 23: 1048.

9 Přílohy

Příloha 1: Charakteristika 18 polymorfních lokusů na 32 geneticky odlišných jedincích rakytníku řešetlákového. Výstup z programu Cervus 3.0.7.

Locus	k	Ho	He	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
USSM3	12	0.938	0.897	0.872	0.383	0.235	0.086	0.025	0.315	NS	-0.0309
USSM5	7	0.531	0.632	0.568	0.781	0.623	0.443	0.197	0.488	NS	0.0868
USSM7	9	0.875	0.825	0.790	0.533	0.359	0.175	0.058	0.358	NS	-0.0445
USSM25	9	0.438	0.610	0.578	0.779	0.592	0.380	0.182	0.495	NS	0.1585
USSM30	3	0.500	0.621	0.539	0.813	0.671	0.521	0.223	0.500	NS	0.0910
USSM50	4	0.563	0.629	0.560	0.794	0.638	0.469	0.204	0.491	NS	0.0613
SB2	3	0.156	0.201	0.183	0.980	0.905	0.831	0.658	0.816	ND	0.1129
SB3	8	0.813	0.828	0.790	0.540	0.365	0.186	0.059	0.357	***	-0.0077
SB4	6	0.531	0.669	0.615	0.750	0.575	0.387	0.160	0.461	NS	0.1215
SB7	2	0.406	0.507	0.375	0.875	0.813	0.719	0.375	0.594	NS	0.1030
SB8	4	0.625	0.705	0.632	0.741	0.580	0.417	0.156	0.442	NS	0.0542
SB10	5	0.250	0.522	0.482	0.855	0.691	0.512	0.268	0.560	*	0.3699
SB11	3	0.594	0.466	0.411	0.895	0.761	0.621	0.341	0.606	NS	-0.1580
SB13	4	0.313	0.593	0.496	0.825	0.704	0.560	0.261	0.523	NS	0.3096
SB14	4	0.688	0.740	0.677	0.698	0.526	0.353	0.125	0.417	NS	0.0271
SB18	6	0.469	0.629	0.550	0.790	0.646	0.479	0.215	0.494	NS	0.1431
SB20	12	0.906	0.847	0.816	0.487	0.319	0.142	0.046	0.344	NS	-0.0475
SB22	4	0.563	0.552	0.491	0.845	0.696	0.533	0.261	0.544	NS	-0.0257

Legenda:

k	počet nalezených alel na lokus
H _o	pozorovaná heterozygotnost
H _E	očekávaná heterozygotnost
PIC	vypovídací hodnota lokusu
NE-1P	pravděpodobnost chybného přiřazení prvního rodiče k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů
NE-2P	pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče k mláděti v případě, že je znám první z rodičů
NE-PP	pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti
NE-I	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců
NE-SI	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou příbuzných mláďat
HW	soulad/odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy
NS	lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
ND	lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
*	signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 5 %
***	signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %
F (Null)	pravděpodobnost výskytu nulových alel

Number of individuals:	32
Number of loci:	18
Mean number of alleles per locus:	5,833
Mean proportion of loci typed:	1,0000
Mean expected heterozygosity:	0,6375
Mean polymorphic information content (PIC):	0,5792
Combined non-exclusion probability (first parent):	0,00295396
Combined non-exclusion probability (second parent):	0,00003333
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0,00000003
Combined non-exclusion probability (identity):	$6,506 \cdot 10^{-15}$
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0,00000162