

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Asociace mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu
v hlízách bramboru**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Telepovská

Výživa a potraviny

Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Asociace mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách bramboru" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Vladimíře Sedlákové Ph.D. za odborné vedení a podněty k tvorbě diplomové práce a za čas, který mi věnovala. Další poděkování patří Ing. Daniele Čílové za pomoc a dozor při přípravě vzorků v laboratoři a Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za pomoc při vyhodnocování vzorků na kapilární elektroforéze.

Asociace mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách bramboru

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá analýzou a charakteristikou polymorfních mikrosatelitů u odrůd bramboru (*Solanum tuberosum* L.) s různým potravinářským zaměřením a následnou asociací s obsahem škrobu v hlízách bramboru.

První třetina teoretické části této diplomové práce je věnována charakteristice brambor, jejich složení, potravinářskému využití i genomu. Další část práce popisuje genetické markery, a to s bližším zaměřením na mikrosatelity, zabývá se jejich mutacemi, strukturou i vlastnostmi. Závěr teoretické části práce pak pojednává o škrobu jako takovém, o jeho vlastnostech, o trávení škrobu i biodegradaci.

V praktické části byla optimalizována PCR reakce 17 jaderných mikrosatelitních markerů v podobě tří multiplexů. Po PCR reakci byly vzorky připraveny pro kapilární elektroforézu. Výsledná molekulární data celkem 153 odrůd byla asociována s obsahem škrobu v hlízách bramboru.

Alelická data z SSR markerů byla rozříděna a zpracována v MS Excel. Data byla následně analyzována pomocí programu DARwin, ve kterém byly vytvořeny dendogramy testované populace. Na základě výsledků těchto analýz byly vyvozeny závěry o asociaci mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách bramboru. Bylo zjištěno, že není možné asociovat polymorfismus mikrosatelitní DNA a obsah škrobu v hlízách bramboru.

Klíčová slova: odrůdy bramboru; DNA; PCR; mikrosatelity; škrob

Association of microsatellite polymorphisms with content of starch in potato tubers

Summary

This thesis deals with the analysis and characterization of polymorphic microsatellites of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) with different food orientations and their subsequent association with starch content in potato tubers.

The first third of the theoretical part of this thesis is devoted to the characterization of the potato, its composition, food uses and genome. The next part of the thesis describes genetic markers, with a closer focus on microsatellites, dealing with their mutations, structure and properties. The theoretical part of the thesis concludes with a discussion of starch itself, its properties, starch digestion and biodegradation.

In the practical part, the PCR reaction of 17 nuclear microsatellite markers was optimized in the form of three multiplexes. The resulting molecular data of a total of 153 cultivars were associated with the starch content of potato tubers.

The allelic data from SSR were sorted and processed in MS Excel. The data were then analyzed using DARwin software to generate dendograms of the test population. Based on the results of these analyses, conclusions were drawn about the association of microsatellite polymorphisms with starch content in potato tubers. It was found that it is not possible to associate microsatellite DNA polymorphism and starch content in potato tubers.

Keywords: potato varieties; DNA; PCR; microsatellites; starch

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Brambory	10
3.1.1 Historie brambor	10
3.1.2 Lilek brambor	10
3.1.3 Nutriční složení brambor	11
3.1.4 Potravinářské využití brambor.....	15
3.1.4.1 Varné typy brambor.....	16
3.1.5 Skladování brambor.....	16
3.1.6 Odrůdy brambor.....	17
3.2 Brambory a genetika	18
3.2.1 Šlechtění brambor	18
3.2.2 Genom bramboru	18
3.3 DNA markery	20
3.3.1 Polymorfismus DNA	20
3.3.2 Rozdělení DNA markerů	21
3.3.3 Mikrosatelity	21
3.3.4 PCR.....	23
3.4 Škrob	25
3.4.1 Amylopektin	25
3.4.2 Amylosa.....	25
3.4.3 Bramborový škrob	26
3.4.4 Biosyntéza škrobu.....	27
3.4.5 Trávení škrobu	28
3.4.6 Resistentní škrob.....	28
3.4.7 Degradace škrobu	28
3.4.8 Fosforylace bramborového škrobu	28
3.4.9 Škrobnatost	29
3.4.10 Analýza škrobu	29
4 Metodika	30
4.1 Rostlinný materiál	30
4.2 Izolace DNA	30
4.3 Primery	31
4.3.1 Charakteristika markerů.....	31
4.4 Příprava PCR	33
4.5 Příprava vzorků pro kapilární elektroforézu	35

4.6	Statistické zpracování dat.....	35
5	Výsledky.....	37
5.1	Charakteristika hodnocených odrůd brambor	37
5.1.1	Země původu jednotlivých odrůd	37
5.2	Alely hodnocených odrůd	38
5.3	Odrůdové zastoupení brambor	41
5.4	Dendogramy.....	42
6	Diskuze.....	44
6.1	Fenotypové hodnocení odrůd	44
6.2	Vyhodnocení alelického profilu odrůd	44
6.2.1	Dendogram pro marker STG0001	46
6.2.2	Dendogram pro marker STG0010	46
6.2.3	Dendogram pro marker STI0012	46
6.2.4	Dendogram pro marker STM1052.....	47
6.2.5	Dendogram pro marker STM1064.....	47
6.2.6	Dendogram pro marker STM1104.....	47
6.2.7	Dendogram pro marker STM0031.....	48
6.2.8	Dendogram pro marker STM5114.....	48
6.2.9	Dendogram pro marker STM0019.....	48
6.2.10	Dendogram pro marker STI0033	49
6.2.11	Dendogram pro marker STI0003	49
6.2.12	Dendogram pro marker STI0014.....	49
6.2.13	Dendogram pro marker STI0032	49
6.2.14	Dendogram pro marker STI0004	50
6.2.15	Dendogram pro marker STM1053.....	50
6.2.16	Dendogram pro marker STM5127	50
6.2.17	Dendogram pro marker STG0016	51
6.3	Celkové vyhodnocení	51
7	Závěr	52
8	Literatura.....	53
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	59
10	Seznam obrázků a tabulek	60
11	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Mikrosatelitní SSR markery (simple sequence repeat) jsou krátké tandemové repetice DNA, které se vyskytují v genomech eukaryotních i prokaryotních organismů. Délka základního motivu se pohybuje od 1 do 6 bp. Mohou se opakovat v počtu do 60 repetic. Vzhledem k tomu, že SSR markery mutují 10000x rychleji než jiné oblasti genomu, jsou považovány za vysoce polymorfní. Polymorfismus mikrosatelitních SSR markerů je využíván v DNA fingerprintingu, MAS, genetickém mapování anebo studiu genetické diverzity.

Brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří mezi nejvýznamnější světové zemědělské plodiny, a to hned po rýži, pšenici a kukuřici. Tato plodina se neustále šlechtí a vznikají nové a nové odrůdy, které svými vlastnostmi odpovídají zamýšlenému způsobu použití. To závisí kupříkladu na tvaru a velikosti hlíz, obsahu redukujících cukrů či na škrobnatosti. V potravinářství mohou být brambory využívány k výrobě bramborového škrobu, hranolek, lupínků, kaše či jako brambory konzumní. V současné době je pěstováno sedm druhů bramboru, je známo více než 4000 odrůd, ale běžně se využívá jen několik desítek z nich.

Genetický výzkum se v minulosti již zabýval analýzou DNA brambor. Bylo vytvořeno několik panelů SSR markerů, které indikují značné polymorfismy mikrosatelitů. Ty se dají považovat za silné, alespoň co se týče pravidelné disperze mezi genomy a rozsahu polymorfismu. Z tohoto důvodu je možno mikrosatelity používat pro určování genetických zdrojů brambor, mohou být užitečné také pro studium genetické nestability rostlin (Ghislain et al. 2009).

Tato diplomová práce se bude zabývat asociací mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách bramboru. Bude v ní charakterizováno celkem 153 českých a evropských odrůd bramboru na základě polymorfismů SSR markerů navržených pro jadernou DNA. Bude optimalizována PCR reakce 17 jaderných mikrosatelitních SSR markerů v podobě tří multiplexů. Získaná molekulární data budou asociována s obsahem škrobu v hlízách bramboru.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Vědeckou hypotézou této diplomové práce je, že polymorfismus mikrosatelitní jaderné DNA je možné asociovat s obsahem škrobu v hlízách bramboru.

Cílem práce je genetická analýza jaderné DNA u vybraných odrůd bramboru (*Solanum tuberosum* L.) s různým potravinářským využitím pomocí mikrosatelitních SSR markerů. Dílčím cílem práce je analýza získaných molekulárních dat a následná asociační studie mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách bramboru.

3 Literární rešerše

3.1 Brambory

3.1.1 Historie brambor

Brambory se jevily jako zajímavé plodiny pro obyvatele severozápadní Bolívie a jižního Peru již před 7000 lety (Spooner et al. 2005). Tehdy byly terčem zájmu pro tamní sběrače. Na pobřeží Ancón byly nalezeny nejstarší zbytky hlíz, které byly archeologicky ověřené. Stáří těchto hlíz se odhaduje na rok 2500 před naším letopočtem (Martins-Farias 1976).

Do Evropy byly brambory přivezeny v průběhu šestnáctého století, roku 1567 na Kanárské ostrovy a roku 1570 do Španělského Seville (Hawkes & Francisco-Ortega 1992). V té době byly brambory podávány nemocným v karmelitánské nemocnici v Seville, přičemž se u nich projeví pozoruhodné léčivé účinky (Oliemans 1988). Mezi první pěstitele brambor v Evropě patřila protestantská skupina s názvem Waldensians, která těžila z toho, že brambory jsou produktivní a díky tomu, že se nejedná o obilninu, nemusí být zdaněny. Příslušníci skupiny Waldensians se pak přestěhovali do protestantských oblastí Německa, Nizozemska a Francie (Reader 2008).

Od té doby se brambory rozšířily do celého světa, kde se v mnoha zemích staly základní plodinou. Během let se měnily preference spotřebitelů brambor. Postupně vznikaly nové trendy a docházelo k inovacím potravinářských technologií. Brambor však dosud zůstává cennou potravinou s antioxidačními účinky obsahující důležité minerály a vitamíny (Brown 2005).

Mezi první lidi, kteří se zabývali šlechtěním brambor, byl roku 1807 Knight (Knight 1807). Od počátku 20. století docházelo k výraznému vývoji odrůd brambor. V důsledku tohoto jevu se začalo uchylovat ke komerčním bojům mezi pěstiteli brambor. Zavádění nových odrůd brambor tak nabralo rychlé tempo (Burbank 1914).

3.1.2 Lilek brambor

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.), jinak také brambor obecný (Slavík 2000) je víceletá hlíznatá rostlina, kterou řadíme do čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Do čeledi lilkovitých kromě bramboru náleží i další zemědělsky významné plodiny, jako je kupřikladu paprika (*Capsicum*), rajče (*Solanum*) anebo tabák (*Nicotiana*). Do rodu *Solanum* L. patří zhruba 900 druhů rostlin (Hawkes 1990).

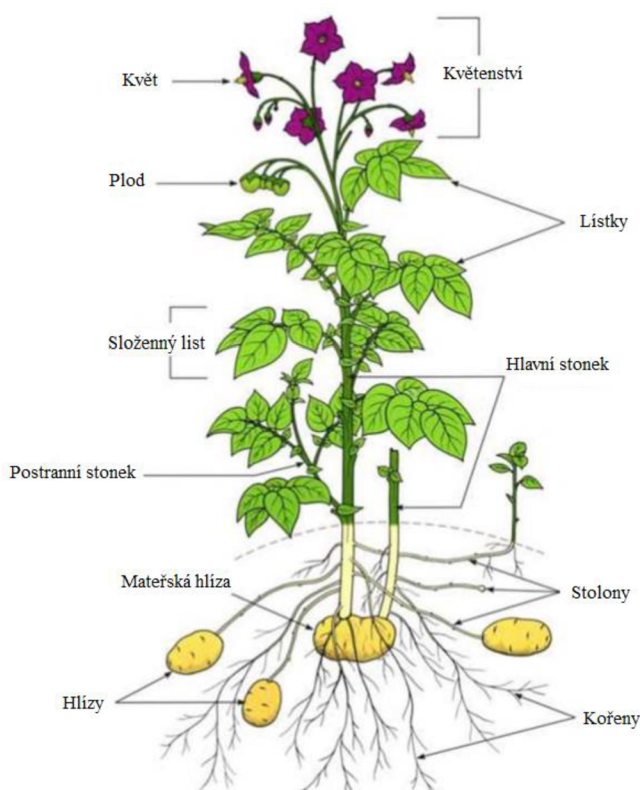
Brambor v současné době patří mezi nejvýznamnější zemědělské plodiny, konkrétněji je čtvrtou nejvýznamnější světovou plodinou po rýži (*Oryza*), pšenici (*Triticum*) a kukuřici (*Zea*) (Singh & Kaur 2016). Pro zemědělské účely se lilek brambor pěstuje jako jednoletá rostlina. Celá rostlina je kromě hlíz jedovatá. Brambor řadíme mezi tzv. C3 rostliny. Brambor náleží mezi plodiny, které mají potenciál uspokojit rostoucí světovou poptávku po potravinách. To činí především to, že brambor produkuje nejvyšší množství proteinu a sušiny na jednotku plochy a času (Gopalan et al. 1972).

Bylina má hranatou lodyhu, která je bohatě rozvětvena. Na lodyze se tyčí krátké chloupky. Rostlina bramboru dorůstá dokonce do výšky jednoho metru. Květy bílého až fialového zbarvení mají žluté ba i oranžové tyčinky. Plodem brambor jsou zelené bobule mající v průměru 3 cm. Tyto bobule obsahují bílá semena. Některé plody bramboru mohou obsahovat

dokonce 300 semen. Řapíkaté listy bramboru jsou dlouhé zhruba 40 cm, jsou lichozpeřené, posety chloupky a drobnými žlázkami (Obrázek 1). Pro lilek brambor jsou charakteristické svazčité kořeny a hlízy rozmanitých tvarů (Cutter 1978).

Pro brambory je vhodné chladnější vlhké klima. Takové klima je spojeno s USA, Ruskem nebo severem Evropy. Brambor nesnáší mrazy, pohybují-li se teploty dlouhodobě pod bodem mrazu, mohou bramborové hlízy zamrznout. Pro klíčení bramborových hlíz je teplota důležitá. Probouzejí se při teplotách kolem 6 °C. Vhodné teploty pro další růst brambor se pohybují okolo 20 °C. Co se týče typu půdy, nejsou brambory příliš náročné. Nevyhovují jim nehumózní váté písky a příliš zamokřené půdy. Pěstební oblasti brambor se nacházejí především v bramborářské oblasti, ale také v oblasti kukuřičné nebo řepářské (Čermák 2021).

Z údajů ČSÚ (2020) vyplývá, že roku 2020 bylo na území České republiky osázeno 29 821 ha brambor, z toho 5 774 ha brambor sloužících pro produkci škrobu. Za rok 2019 činila celková produkce brambor 756 310 tun. Téhož roku se průměrný hektarový výnos pohyboval okolo 26,2 t/ha (Žižka 2020).



Obrázek 1 Rostlina bramboru obecného (*Solanum tuberosum* L.) (<https://cipotato.org/potato/how-potato-grows/>).

3.1.3 Nutriční složení brambor

Brambor se vyznačuje svou vysokou výživovou hodnotou (Tabulka 1). Již po staletí brambor patří mezi základní světovou potravinu, a to hlavně díky jeho odolnosti, hospodárnosti a obsahu živin, jako je vitamin C, vitaminy skupiny B, draslík či vláknina (Gopalan et al. 1972). Brambory mají potenciál ovlivňovat některé rizikové faktory chronických onemocnění, kupříkladu obsah lipidů v krvi, krevní tlak anebo záněty. Některé studie naopak prokázaly

riziko vzniku onemocnění diabetes mellitus druhého typu a přibírání na hmotnosti související s konzumací brambor, pravděpodobně díky jejich vysokému glykemickému indexu (Beals 2019).

Tabulka 1 Výživové parametry pro brambory vařené se slupkou a beze slupky (Wijesinha-Bettoni & Mouillé 2019)

	Brambory se slupkou (na 100 g čerstvé hmoty)	Brambory beze slupky (na 100 g čerstvé hmoty)
Tuky (g)	0,1	0,1
Bílkoviny (g)	1,9	1,7
Vitamin C (mg)	13	7,4
Thiamin (mg)	0,11	0,10
Riboflavin (mg)	0,02	0,02
Niacin (mg)	1,44	1,31
Vitamin B6 (mg)	0,30	0,27
Kyselina listová (µg)	10	9
Železo (mg)	0,3	0,3
Vápník (mg)	5	8
Hořčík (mg)	0,3	0,3

Velký podíl z bramborové hlízy tvoří voda. Bramborová hlíza totiž obsahuje zhruba 76 % vody (Burton 1989). Obsah dalších látek v bramborách značně kolísá. Kupříkladu škrob se v bramborách vyskytuje od 8 do 29,5 %. Hlíza bramboru obsahuje průměrně 1,1 % popelovin. Tento obsah závisí na obsahu popelovin v půdě a na prostředí (Gopalan et al. 1972).

Brambory obsahují v průměru 20 % sacharidů. Největší procento z toho zaujímá škrob, dále také další polysacharidy, jako jsou pektiny, vláknina, hemicelulózy, pentozany a hexozany. V čerstvých bramborových hlízách činí obsah nerozpustné vlákniny, která je pro člověka nestravitelná, 2,4-3,2 % a obsah rozpustné vlákniny 2,8-3,5 % (Stephen et al. 2017). Z jednoduchých cukrů obsažených v bramboru stojí za zmínku monosacharidy glukóza a fruktóza a disacharid sacharóza. Obsah cukrů je významný především u potravinářských produktů, neboť mohou nepříznivě ovlivňovat jejich skladovatelnost, chuť a barvu. Příčinou je Maillardova reakce, během níž za vyšší teploty reagují redukující cukry s aminokyselinami, díky čemuž dochází ke vzniku tmavých polymerizovaných nerozpustných melanoidinů (Tareke et al. 2002).

Obsah dusíkatých látek v bramborové hlíze je poměrně nízký, pohybuje se mezi 1-3 % (Woolfe 1987). Vlivem podmínek prostředí a genotypu může podíl bílkovin kolísat. Bramborové hlízy se vyznačují velmi hodnotnými bílkovinami, což udává vysoké zastoupení esenciálních aminokyselin (83 % vaječného standardu). 20-40 % hlízových bílkovin představuje patalin, což je glykoprotein, který se účastní obranných reakcí organismu. 30 % hlízových bílkovin zaujímá skupina inhibitorů proteas, která má největší význam jakožto zásobní bílkoviny a také jakožto součást obranného mechanismu, a to především proti hmyzu (Pouvreau et al. 2001). Inhibiční účinky má tato skupina i na trávicí enzymy, z tohoto důvodu

je nutné hlízy před konzumací dostatečně tepelně upravit. Bramborový protein obsahuje vysoký podíl lyzinu, a naopak jen malé množství methioninu (Lisinska & Lezczynski 1989).

Lipidy jsou v bramborových hlízách obsaženy ve velmi malých množstvích, zhruba 0,15-0,5 % (Raigond et al. 2020). Nejvíce tuků obsahuje bramborová slupka. Hrubý tuk se rozděluje na čtyři frakce, a to na volné mastné kyseliny (linolová, linoleová, stearová a palmitová kyselina), neutrální tuk a fosfolipidy. Tuhy mají největší význam u sušených výrobků, kde se jejich koncentrace až čtyřnásobně zvyšuje. Vlivem špatného skladování hrozí znehodnocení výrobku změnou chuti a vůně (Dimante et al. 2013).

Brambory jsou důležitým zdrojem vitamínu C. Obsah vitamínu C v bramborové hlíze se zvyšuje během vegetace. Po uskladnění brambor dochází k rychlému úbytku vitamínu C v bramborách, který se však postupem času zpomaluje (Külen et al. 2013). V bramborách zůstává na jaře zhruba 40 až 70 % prvotního obsahu vitamínu C. Bramborová hlíza obsahuje přibližně 840-1450 mg/kg vitamínu C. Obsah vitamínu C závisí na skladovacích podmínkách, odrůdě i místě výsadby. Další ztráty mohou být způsobeny tepelnou úpravou (Tabulka 2). Při vaření ve vodě se ztráty pohybují mezi 16-34 % (Love & Pavek 2008). V bramborech se vyskytují i další vitamíny, a to především vitamíny skupiny B – thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin anebo kyselina listová (Beals 2019).

Tabulka 2 Rozsah ztrát vitamínu C v bramborových hlízách, které byly vystaveny různým způsobům přípravy (Love & Pavek 2008).

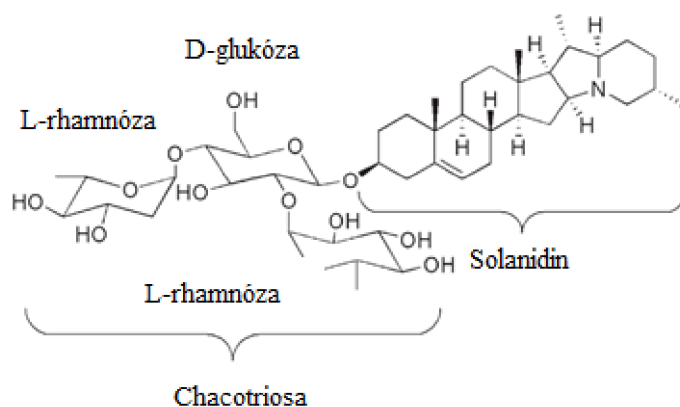
Způsob přípravy	Rozsah ztrát (%)
Pečení	15-28
Ohřev v mikrovlnné troubě	12-27
Vaření oloupaných brambor	23-34
Vaření neloupaných brambor	16-21
Smažení	15-49
Kaše	20-67
Dehydratace	50-81

Minerální látky jsou v hlíze nerovnoměrně rozloženy. Minerální látky v bramboru tvoří komplex mnoha prvků. Nejvýznamnější minerální látkou, která je v bramboru obsažena, je draslík. Obsah draslíku v hlíze činí v průměru 1,7-2,0 % (Casanias et al. 2002). Přítomnost draslíku v bramborové hlíze snižuje enzymatické hnědnutí brambor vzniklé následkem mechanického poškození hlízy i tmavnutí brambor po uvaření. Draslík je důležitý i pro bramborovou hlízu, a to kvůli syntéze škrobu (Sanchez-Castillo et al. 1998). Obsah draslíku je důležitý především proto, že vyvažuje poměr mezi sodíkem a draslíkem. Tento vztah je důležitý kvůli regulaci nervových pochodů, kdy draslík potlačuje nervové vzněty. Z minerálních látek obsažených v bramboru stojí za zmínku také selen, jež funguje jako antioxidant a zabraňuje reakcím volných radikálů (Camire et al. 2009).

Brambory jsou bohaté také na antioxidanty. Antioxidantem se rozumí látka, která zabraňuje, blokuje či zpomaluje oxidační přeměny látek v lidském organismu. V lidském organismu také snižují aterosklerotické procesy anebo se podílejí na snížení rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Mezi nejvýznamnější antioxidanty brambor patří karotenoidy a flavonoidy. Do skupiny karotenoidů můžeme zařadit zeaxantin (0,04 mg/kg), lutein (0,13-

0,60 mg/kg) a violaxantin. Vysokým obsahem karotenoidů (zhruba 14 mg/kg) jsou charakteristické diploidní kultivované brambory (Brown 2005).

Alkaloidy jsou přirozené toxiny, které se vyskytují ve všech částech bramboru. Do skupiny alkaloidů bramboru náleží steroidní glykoalkaloidy (SGA). Mezi SGA patří především α -solanin a α -chaconin (Obrázek 2), které tvoří zhruba 95 % všech toxických glykoalkaloidů nacházejících se v bramboru (Mäder et al. 2009). Poměr α -solaninu a α -chaconinu by měl činit 1:1,7. V menším množství jsou v bramborách přítomny i další SGA, jako je β 1-solanin, β 2-solanin, γ -solanin, γ -chaconin, β 1-chaconin a β 2-chaconin. Tomatin, solanin a chaconin jsou považovány za inhibitory nádorů (Lee et al. 2004). Obsah glykoalkaloidů v bramborách závisí na povětrnostních podmínkách v průběhu vegetace a na stupni zralosti. Glykoalkaloidy ovlivňují chuť brambor svou hořkou chutí a palčivostí. Také mohou být toxické, mohou způsobovat zvracení a nevolnost (Hopkins 1995). Většina konzumních odrůd brambor obsahuje 120–150 mg glykoalkaloidů na 1 kg čerstvé hmoty. Koncentrace solaninu v čerstvé bramborové hlíze by neměla překročit 180 mg/kg (Valkonen et al. 1996).



Obrázek 2 – Struktura α -chaconinu (Mäder et al. 2009).

Bramborové hlízy též obsahují rizikové látky. Jedná se o látky, které představují případné riziko po jejich požití. Mezi tyto rizikové látky můžeme zařadit látky, které vznikají během tepelné úpravy brambor. Během smažení, pečení, grilování či fritování brambor bývají brambory vystaveny vysokým teplotám, a právě v průběhu těchto vysokých teplot vzniká akrylamid, který je vedlejším produktem hnědnutí. Akrylamid je potenciálně mutagenní látka (Tareke et al. 2002). Dalším způsobem, jak se mohou rizikové látky do brambor dostat, je jejich příjem z prostředí, například z chemizace v zemědělství. Například dusičnany mohou v nadměrných množstvích způsobit závažné zdravotní potíže. Obsah dusičnanů v bramborách je ovlivněn odrůdou, hnojením dusíkatými hnojivy, prostředím anebo skladováním. Obsah dusičnanů v bramborových hlízách se pohybuje mezi 30-600 mg na 1 kg čerstvé hmoty (Heisler et al. 1973). Do brambor se kvůli kontaminaci životního prostředí mohou dostat těžké kovy, jako je olovo, arsen, rtuť, cín, chrom anebo nikl. Ty v malém množství nejsou toxické pro rostliny, ale jsou toxické pro živočišné organismy, do kterých se dostanou díky potravnímu řetězci (Adriano 1992).

3.1.4 Potravinářské využití brambor

Existují hlavní tři důvody pro pěstování brambor. Prvním důvodem je obchodování s bramborovými hlízami jakožto čerstvými potravinami. Dalším hlavním důvodem je výroba produktů z brambor, mezi které patří například mražené bramborové hranolky či bramborové lupínky. Posledním důvodem je nepotravinářské průmyslové využití brambor, kupříkladu výroba modifikovaných škrobů (Mohanty et al. 2004). V České republice je ke konzumním účelům využito 78 % brambor, z toho 22 % zabírají brambory sloužící k produkci potravinářských výrobků (Žižka 2020).

Jakost brambor ovlivňuje mnoho činitelů. Hodnoceny jsou především čtyři základní oblasti, a to senzorické vlastnosti, tržní vlastnosti, technologická hodnota a fyziologická kritéria. Závisí na způsobu užití hlíz, která z těchto oblastí je nejdůležitější. Při určování senzorických vlastností je hodnocena především chuť a vůně brambor, ale i jejich textura. Mezi tržní vlastnosti náleží velikost a tvar hlíz, ale také odrůdová jednotnost a obsah příměsí. Pod tržní vlastnosti taktéž spadá rozdělení bramborových hlíz na rané a pozdní (Ministerstvo zemědělství 2021). Rané brambory bývají sklizené do 31. 8. sklizňového roku, bývají tedy sklizeny před dosažením plné zralosti a nejsou vhodné k dlouhodobějšímu skladování. Doba ke sklizni pozdních brambor nastává po dosažení jejich plné zralosti, tedy po 1. 9. sklizňového roku. Pozdní brambory jsou vhodné k dlouhodobějšímu skladování. Technologická hodnota brambor se posuzuje dle škrobnatosti, strupovitosti anebo vlastností slupky, specificky pak kupříkladu podle velikosti škrobových zrn anebo dle obsahu redukujících cukrů. Z fyziologického kritéria jsou důležité znaky vnější jakosti, jako je strupovitost, velikost a tvar hlíz, mechanické poškození či barva slupky a znaky vnitřní jakosti, mezi které patří moučnatost, barva dužiny nebo rozvařivost (Čermák 2021).

Výrobky z brambor můžeme definovat jakožto výrobky z konzumních brambor, které byly upraveny technologickým procesem, a to především smažením, loupáním, sušením anebo konzervací. Smažené výrobky jsou výrobky, které jsou smaženy na tuku či oleji. Smažením dochází u hranolků ke snížení celkové vlhkosti o 20 %, u bramborových lupínků může klesnout vlhkost až na 2 %. Vyhláška č. 397/2021 Sb (Ministerstvo zemědělství 2021) ustanovuje členění výrobků z brambor tak, jak je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Členění výrobků z brambor na skupiny (Ministerstvo zemědělství 2021).

Druh	Skupina
Výrobky z brambor	Brambory konzumní syrové loupané Brambory konzumní sušené Brambory konzumní loupané předvařené, vařené nebo jinak konzervované Bramborová kaše sušená Bramborová mouka Bramborové lupínky smažené Bramborové plátky předsmažené Bramborové hranolky předsmažené Bramborové krokety předsmažené Bramborová kaše vařená

3.1.4.1 Varné typy brambor

Konzumní brambory je možno rozdělit do tří varných typů. Varný typ A se vyznačuje pevnou konzistencí. Tyto hlízy jsou nerozvařivé a lojovité. Užívají se nejčastěji do salátů či jako příloha. Pro varný typ B je typická polomoučná, polopevná, nerozvařivá až slabě rozvařivá konzistence. Brambory spadající pod varný typ B se využívají jakožto příloha. Brambory patřící do varného typu C jsou středně rozvařivé, měkké a moučné. Tyto hlízy jsou vhodné zejména pro přípravu bramborových kaší a bramborových těst (Ministerstvo zemědělství 2021).

3.1.5 Skladování brambor

Skladovatelnost brambor můžeme vyložit jakožto schopnost bramborových hlíz zachovat si nutriční, organoleptické i technologické vlastnosti spolu s minimálními hmotnostními ztrátami. Skladovatelnost je ovlivněna vnitřními činiteli – zdravotním stavem, látkovým složením anebo anatomickou stavbou, a vnějšími činiteli – teplotou, světlem, vlhkostí anebo přístupem vzduchu (Jun 1983).

Požadavek na vlhkost vzduchu v průběhu skladování brambor činí 85-90 % relativní vlhkosti. Při vlhkosti pod 80 % dochází k nadměrnému výparu, důsledkem čehož je zhoršení technologických i stolních hodnot. Naopak při vlhkosti nad 90 % hrozí zhoršení dýchání a mikrobiální kontaminace. Během skladování je důležitý přístup vzduchu pomocí větrání, neboť dýchání ovlivňuje výpar vody, obsah sušiny anebo látkové složení. Intenzita dýchání je udávána složením vzduchu, teplotou a zdravotním stavem. Jakost hlíz, zejména obsah solaninu a chlorofylu, ovlivňuje světlo. Teplota během skladování ovlivňuje mikrobiální procesy, klíčení, dýchání i rozkladné procesy. Optimální teplota ve skladu se pohybuje mezi 3-5 °C. Při teplotě nad 6 °C dochází ke zvýšení biologické aktivity, a tím i ke zvýšení mikrobiálních procesů, zvýšení intenzity dýchání anebo nebezpečí klíčení (Jun & Novotňáková 1982).

Skladovací cyklus brambor je možno rozdělit na následující etapy. Zpočátku, prvních 10-14 dní, probíhá etapa hojení hlíz. Jestliže se teplota vzduchu pohybuje okolo 14 °C, dochází v místě poranění hlíz k urychlení tvorby korkového pletiva – tzv. suberizaci. Jako další etapa následuje vydýchávání hlíz, která probíhá po dobu 3-5 týdnů. Následujících 4-5 týdnů dochází ke zchlazování hlíz, kdy teplota vnějšího vzduchu je o 2-5 °C nižší než-li teplota hlíz. Po zchlazení následuje etapa klidu, u konzumních brambor při 5-8 °C. Před vyskladněním je nutno hlízy ohřát na teplotu 10-12 °C (Jun 1983).

Existuje mnoho způsobů skladování brambor. K nejstarším z nich patří uskladnění ve sklepech či komorách. Takto skladované brambory bývaly často znehodnoceny hnilobou či mrazem. Později se brambory uchovávaly na poli v jámě hluboké asi jeden metr, zakryté vrstvou slámy a zeminy. Další možností skladování brambor jsou krechty, jejichž užívání se zahájilo ve 40. letech 20. století. Jedná se o dočasné či trvalé stavby určené pro venkovní skladování bramborových hlíz (Jun & Novotňáková 1982). Je zde obtížné regulovat skladovací činitele anebo ztráty způsobené drobnými savci. V současné době jsou ke skladování brambor nejhojněji používány sklady brambor, jinak řečeno bramborárny. Jedná se o stavby určené pro skladování bramborových hlíz. Sklady brambor se dají rozdělit na paletové sklady a na sklady volně ložených brambor. Mezi základní vybavení bramborových skladů patří zařízení pro manipulaci, pro naskladňování a vyskladňování brambor, dále třídící zařízení a zařízení sloužící k regulaci škodlivých činitelů (Dudáš 1981).

3.1.6 Odrůdy brambor

Odrůdou se rozumí soubor rostlin, který patří k nejnižšímu stupni botanického třídění, jež je vymezený projevem znaků vyplývajících z určitého genotypu či z kombinace genotypů. Tento soubor rostlin je dle zákona č. 334/2020 Sb. odlišitelný od ostatních souborů rostlin projevem alespoň jednoho z těchto znaků (Ministerstvo zemědělství 2020). Na světě je známo více než 4000 odrůd brambor. Běžně využíváno je několik desítek z nich. Bramborové hlízy mohou být různých velikostí i tvarů od kulatých až po podlouhlé, zakroucené. Také barva hlíz je variabilní. Zbarvení bramborové slupky může být žluté, hnědé, sytě červené anebo kupříkladu fialové. Dužnina bramboru může být zbarvena do žluta, ale také do růžova či do fialova (Čermák 2021).

Každá odrůda je vhodná k jinému užitkovému směru. Závisí na její škrobnatosti, obsahu redukujících cukrů, tvaru, velikosti... Kvalitu odrůd brambor zajišťuje registrace odrůd. V České republice registraci brambor zajišťuje Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Řídí se přitom zákonem č. 334/2020 Sb. (Ministerstvo zemědělství 2020), který mění zákon č. 219/2003 Sb. (Ministerstvo zemědělství 2003) a pojednává o uvádění sadby a osiva pěstovaných rostlin do oběhu. O podrobnostech týkajících se uvádění sadby a osiva pěstovaných rostlin do oběhu rozhoduje vyhláška č. 129/2012 Sb. (Ministerstvo zemědělství 2012).

3.2 Brambory a genetika

3.2.1 Šlechtění brambor

Šlechtitelské programy řídí ministerstvo zemědělství České republiky. Mezi hlavní cíle šlechtitelských programů patří zlepšení kvality produktu, zvýšení výnosu nebo odolnost proti škůdcům. Některé kultivary jsou díky šlechtění citlivé na herbicidy, které jsou pro použití na brambory registrovány (Dean 1994). Současné kultivary brambor jsou vysoce heterozygotní. Jsou náchylné na různé choroby a patogenní organismy a je pro ně typická imbrední deprese (Bradshaw & Mackay 1994).

Moderní šlechtění brambor započalo roku 1807 v Anglii, kdy byla provedena první hybridizace odrůd pomocí umělého opylení. Brambory se množí povětšinou vegetativně, tedy pomocí klonů, z tohoto důvodu jsou geneticky uniformní. Brambory se rozmnožují z hlíz, semeno brambor je využíváno především pro šlechtitelské účely. Nové kultivary brambor bývají vytvořené z poněkud omezeného genetického poolu, jelikož si jsou geneticky velmi podobné, je velmi obtížné je charakterizovat. Cytologické studie jsou navíc ztíženy z toho důvodu, že mají relativně četné a malé chromozomy (Wilkinson 1994).

Brambor má z kulturních plodin nejbohatší genetické zdroje. Vztahují se k němu dvě centra biodiverzity. Prvním z nich je takzvané andské centrum, které se nachází v okolí jezera Titicaca. Tyto kultivary jsou adaptovány na podmínky krátkého dne. Druhým centrem je chilské centrum, kde jsou kultivary adaptovány na podmínky dlouhého dne. V těchto centrech se nacházejí lokální kulturní i polokulturní odrůdy a jejich divocí příbuzní mající různý stupeň ploidie. Brambor se vyznačuje tím, že má více planě rostoucích příbuzných druhů než ostatní kulturní plodiny (Hawkes 1990).

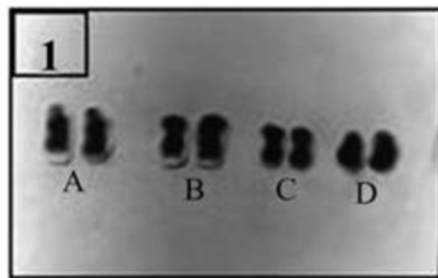
Je pěstováno sedm druhů bramboru. Ty mají chromozomové číslo 12 a vyskytují se v polyploidních sériích. Jedná se o diploidy až pentaploidy. Diploidní druh bramboru *S. stenotomum* je pěstován v oblasti mezi Bolívií a Peru. Předpokládá se, že byl získán z diploidního planého druhu *S. leptophyes* (Bradshaw & Mackay 1994). Mezi triploidní druhy brambor patří ty druhy, které vznikly spontánním křížením mezi tetraploidními a diploidními druhy. Pentaploidní druhy brambor pak mohou vzniknout buď křížením diploidních a hexaploidních druhů anebo křížením tetraploidních a hexaploidních druhů (Hawkes 1990).

3.2.2 Genom bramboru

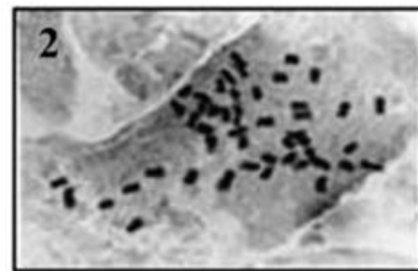
Brambor je polysomická tetraploidní plodina ($2n = 4x = 48$). Jeho základní chromozomové číslo x je rovno dvanácti. Velikost haploidního genomu bramboru činí zhruba 840 milionů bp (párů bází), z čehož vyplývá, že se jedná o středně velký rostlinný genom (Carputo & Frusciante 2011). Jednotlivé chromozomy se vyznačují malou velikostí – v mitotické metafázi mají asi 1-3,5 μm . V cytologických charakteristikách, jako je například celkový objem a délka chromozomů, existuje mezi různými šlechtitelskými liniemi a kultivary vysoká variabilita (Mohanty et al. 2004).

Dle polohy a velikosti zúžení můžeme mitotické chromozomy brambor rozdělit do čtyř skupin. S pomocí sady klonů BAC, čili bakteriálního umělého chromozomu a s pomocí fluorescenčních in situ hybridizačních sond (FISH) mohly být přiřazeny ke konkrétním chromozomům genetické vazebné skupiny brambor (Dong et al. 2000). Existují čtyři

morfologické typy chromozomů, které se označují A-D (Obrázek 3). Velké až středně velké chromozomy mající dvě konstriktce v blízkosti mediánu jsou charakteristické pro skupinu A. Velké až středně velké chromozomy mající dvě konstriktce v blízkosti submediánu náleží ke skupině chromozomů B. Chromozomy malé až střední velikosti jsou řazeny do skupiny C a D, přičemž chromozomy typu C jsou metacentrické, tedy mají primární konstriktci v blízkosti mediánu, zatímco chromozomy typu D jsou submetacentrické, což znamená, že mají primární konstriktci umístěnou poblíž submediánu (Mohanty et al. 2004).



Standardní chromozom



Chromozomy v somatické buňce tetraploidního bramboru ($2n=48$)

Obrázek 3 Standardní typy chromozomů (A-D) × chromozomy v somatické buňce tetraploidního bramboru (Mohanty et al. 2004).

3.3 DNA markery

Genetické markery jsou základní pomůckou, jež je používána ke studiu genetické variability. Pro odlišování odrůd anebo pro genetické analýzy bylo užíváno morfologických markerů (víceřadost, barva semen nebo květů...), a to do počátku 60. let 20. století. Nevýhody morfologických markerů spočívají v nedostačujícím množství variant a v neschopnosti odhalení dostatečného množství genetické variability (Hoshino et al. 2012). Morfologické markery vystřídali markery izoenzymové, jež jsou založené na allozymovém polymorfismu. Pod pojmem izoenzym se skrývá různá forma toho samého enzymu, jež katalyzuje tutéž chemickou reakci s tím rozdílem, že se zde vyskytují aminokyseliny složené v jiném pořadí. Důsledkem rozdílného uspořádání aminokyselin jsou i rozdílné vlastnosti, kupříkladu jiný náboj, hodnota pH i katalytická aktivita. Izoenzymy je možno separovat díky jejich odlišující se rychlosti migrace v průběhu elektroforézy. Rozdílná rychlost migrace izoenzymů během elektroforézy je způsobena rozdílnou primární strukturou. Izoenzymy nejsou schopné odhalit celkovou genetickou diverzitu nebo charakterizovat celý genom, protože reprezentují pouze kódující úseky genomu (White & Cooke 1992).

V současné době jsou často užívány DNA markery, jež hodnotí vlastní strukturu DNA. DNA markery umožňují sledovat, které alely jsou ve zkoumaném vzorku přítomny. Jedná se o jistou informaci o organismu, která byla získána analýzou jeho DNA a která se zakládá na polymorfismu, jehož zdrojem jsou především mutace (Ismail & Essawi 2012). O příbuznosti jedinců, populací či druhů vypovídá sdílený marker. Mezi výhody DNA markerů náleží jejich variabilita a schopnost charakterizovat celý genom. DNA markery nejsou na rozdíl od izoenzymových markerů natolik ovlivněné prostředím, jako jsou kupříkladu posttranslační úpravy (Hoshino et al. 2012). Vlastnosti DNA tudíž závisí výhradně na sekvenci DNA, díky čemuž jsou vysoce spolehlivé. Další výhodou tohoto typu markerů spočívá v rychlosti a spolehlivosti determinace. DNA markery je možné snadno identifikovat základními metodami molekulární biologie, mezi které patří izolace DNA, štěpení restrikčními enzymy, PCR a elektroforéza (Oliveira et al. 2006).

Využity jako DNA markery mohou být jen sekvence s vysokým polymorfismem, díky čemuž je zajištěn podrobný popis genetické diverzity. Je možno pohlížet na DNA markery jakožto na mendelistické znaky. Z tohoto důvodu je výhodné používat kodominantní DNA markery, které umožňují odlišit dominantní homozygoty od heterozygotů. Aby bylo možno vždy najít marker v nejtěsnější vazbě s pozorovaným genem, musí se v genomu vyskytovat často a rovnoměrně (Tautz 1984).

3.3.1 Polymorfismus DNA

Pod pojmem polymorfismus se skrývá variabilita v sekvencích DNA. Právě na polymorfismu se DNA markery zakládají. Polymorfismus na úrovni DNA se může objevovat v mnoha formách. Mezi tyto formy polymorfismu na úrovni DNA patří forma jednonukleotidových polymorfismů, variabilní počet transponovaných prvků, kam můžeme zařadit Alu repetic, variace počtu kopií, strukturální změny a variabilní počet tandemových repetit, mezi které náleží mini a mikrosatelity (Ravishankar & Bommisetty 2013). K polymorfismům na úrovni DNA může docházet jak v jádře, tak i v mitochondriích. Možným

zdrojem polymorfismu jsou mutace, k nimž dochází při náhodných procesech anebo v důsledku vyvolání vnějšími činiteli, mezi které patří záření. Druhým hlavním zdrojem polymorfismu jsou rekombinace (Ismail & Essawi 2012).

3.3.2 Rozdělení DNA markerů

Genetické markery lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to na ty markery, jež jsou založené na PCR a na markery, které jsou založené na hybridizaci se sondou. Mezi markery založené na PCR náleží SSR (simple sequence repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNAP (Single-Nucleotide Amplified Polymorphism), STS (Sequence Tagged Site), anebo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Naopak mezi markery založené na hybridizaci se sondou je možno zařadit RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Weising et al. 1995).

Tyto metody mají své pro a proti. Vhodný typ DNA markerů bývá volen v závislosti na rozsahu studované problematiky. Mezi hlavní výhody markerů, které jsou založeny na PCR, patří menší složitost analýzy a s tím i menší časová náročnost oproti RFLP, jelikož zde odpadá konstrukce sondy a Southernův přenos. Další výhodou markerů založených na PCR je nižší koncentrace výchozí DNA (Tautz 1984). Genetické markery jdou rozdělit i na ty, které jsou spojeny s anonymními genetickými segmenty, sem náleží AFLP nebo RAPD markery a na ty, jež jsou asociovány s geny majícími známou funkci, mezi které patří izoenzymy či EST markery (Liu & Cordes 2004).

3.3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity se dají nazvat také SSR (simple sequence repeats) anebo STR (short tandem repeats). Jedná se o repetitivní DNA, jež se vyskytuje v genomech jak prokaryotních, tak i eukaryotních organismů (Tóth et al. 2000). SSR markery jsou krátké tandemové repetice, přičemž délka základního motivu se pohybuje od 1 do 6 bp (Ellegren 2004), mohou se opakovat v počtu do 60 repetic (Field & Wills 1996). Vyskytují se především v intronech a v nekódujících oblastech, ale je možno je nalézt i v kódujících oblastech (Li et al. 2004). Mikrosatelity vyskytující se v kódujících oblastech bývají obvykle trinukleotidové, což pravděpodobně způsobuje selekční tlak proti mutacím (Ashley & Warren 1995).

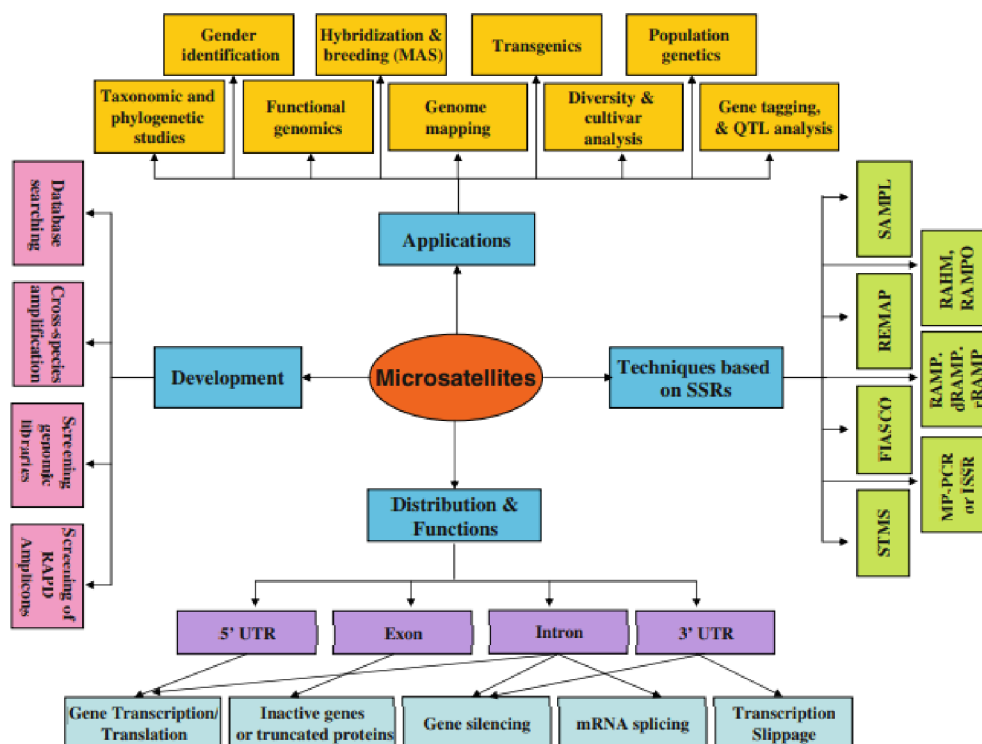
Mikrosatelity je možno rozdělit buď dle délky základní jednotky repetice, a to na mono, di, trinukleové apod., anebo dle struktury. Mikrosatelitové lokusy se dají rozdělit do čtyř základních kategorií, a to na mikrosatelity přerušované, složené, dokonalé a nedokonalé. Mikrosatelity, jež jsou přerušeny sekvencí dvou anebo více bází, se nazývají přerušené (např. CACACATGCACACA) (Tóth et al. 2000). Složené mikrosatelity jsou mikrosatelity, které obsahují odlišné repetitivní sekvence, jež na sebe navazují (např. CACACATGTGTG). Pro sekvence dokonalých mikrosatelitů je typické, že nejsou přerušeny bází nepatřící do repetitivního motivu (např. CACACACACACA). Mikrosatelity, které se označují jako nedokonalé, obsahují v repetici bázi nepatřící do sekvence (např. CACACATCACACA) (Bhargava & Fuentes 2010).

Vzhledem k tomu, že SSR markery mutují 10000× rychleji než jiné oblasti genomu, jsou považovány za vysoce polymorfní. Vyznačují se vysokým PIC (polymorphism information content) neboli obsahem polymorfní informace, jež mají nejvyšší z genetických markerů.

Mohou se užít pro zjištění struktury populace a porovnat variabilitu mezi populacemi (Nordahl et al. 2019). Polymorfismus SSR markerů je možno označit jako SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) a je způsoben různým počtem opakování základního motivu. Polymorfismus mikrosatelitní DNA může být způsoben nerovnoměrným crossing-overem anebo nesprávnou funkcí DNA polymerázy během replikace repetitivních oblastí (Oliveira et al. 2006). Funkci mikrosatelitů, jejich vývoj a aplikaci shrnuje Obrázek 4.

Po izolaci DNA navazuje při analýze mikrosatelitů PCR, během níž je využito specifických primerů, potom elektroforetické rozčlenění amplifikovaných fragmentů s navazující detekcí. Navržené primery by měly být komplementární k úsekům, které s daným mikrosatelitem hraničí. Během PCR se tedy amplifikuje krátký úsek DNA, jež zahrnuje polymorfni sekvenci (Kalendar et al. 1999). Elektroforéza bývá prováděna na polyakrylamidovém či agarózovém gelu. Na základě odlišné pozice fragmentů s určitou velikostí je odhalen polymorfismus (Oliviera et al. 2006).

Další možností elektroforézy je kapilární elektroforéza (CE), což je mikrokolonová separační technika mající vysokou prostupnost vzorku. Výhodou CE je její vhodnost pro separaci řady analytů v různých matricích. Naopak nevýhodou CE je v porovnání s kapalinovou chromatografií nízká koncentrační citlivost kapilární elektroforézy (Horáková et al. 2006). Vytváření nových SSR markerů se zahajuje izolací a následnou charakterizací vybrané oblasti. Dále je nutno určit sekvenci této oblasti a zvolit, syntetizovat a testovat primery. SSR markerů se využívá při mapování genomů anebo pro rozsáhlé populační studie (Oliviera et al. 2006).



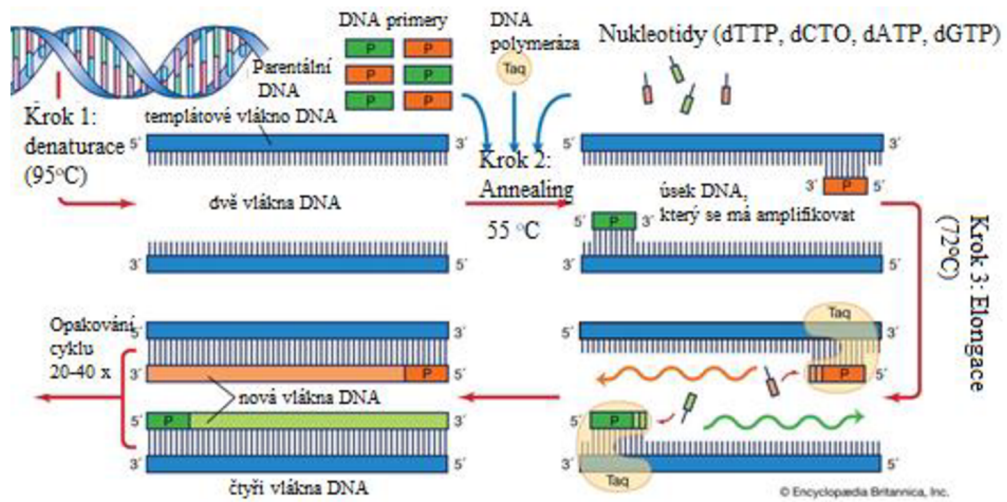
Obrázek 4 Mikrosatelity – shrnutí vývoje, funkce, distribuce a aplikace (Kalia et al. 2011).

3.3.4 PCR

PCR (polymerase chain reaction) lze také přeložit jakožto polymerázová řetězová reakce. Jedná se o metodu zakládající se na principu replikace nukleových kyselin, která má za následek rychlé a snadné zmnožení úseku DNA. PCR je zahájena in-vitro amplifikací, kdy jsou jednotlivé sekvence DNA ohraničeny primery, tedy krátkými oligonukleotidy DNA, a to na jejich začátku i konci (Clark & Pazdernik 2013). Takto amplifikované fragmenty jsou následně elektrofonicky separovány a detekovány rozmanitými metodami barvení. K amplifikaci je za potřebí jen malé množství DNA, ze kterého v průběhu reakce vzniká velké množství kopií o množství mnoha milionů, dosahující délky až 10 tisíc nukleotidů (Tellier et al. 2003).

Součástí reakční směsi používané pro PCR je kromě DNA i enzym DNA polymeráza, směs nukleotidů, dva primery a destilovaná voda jakožto rozpouštědlo jednotlivých komponentů. Pro zajištění správné iontové síly a koncentrace je do reakční směsi přidáván také 10× koncentrovaný pufr. Nejčastěji se k syntéze nového vlákna deoxyribonukleové kyseliny užívá termostabilní Taq polymeráza, kdy se jedná o DNA polymerázu získanou z bakterií *Thermus aquaticus* (Cline et al. 1996). Výsledkem PCR je velké množství kopií původní sekvence DNA, díky čemuž je využívána jak pro vědecké účely, tak i pro laboratorní diagnostiku, kdy pomáhá odhalovat některé infekční a dědičné choroby. PCR je nadále využívána v kriminalistice pro účely identifikace osob, v genetické genealogii anebo ke kontrole potravin. Tato metoda je natolik citlivá, že je schopna ve vzorku odhalit i jedinou molekulu (Clark & Pazdernik 2013).

K polymerázové řetězové reakci dochází v přístroji zvaném termocykler, a to ve třech krocích (Obrázek 5). Během prvního kroku dochází k denaturaci, kdy se vlivem teploty oddělují vodíkové vazby, v důsledku čehož se rozvolní vlákno dvoušroubovice, což znamená, že se dvouvlákno DNA rozpadá na dvě jednotlivá vlákna, na které během dalších operací mohou nasednout primery (Tellier et al. 2003). K denaturaci dochází při teplotě 93-96 °C. Druhým krokem PCR je nasednutí primerů neboli annealing. Během tohoto procesu dochází díky komplementaritě bází k nasedání dvojice primerů na DNA. K nasednutí primerů dochází vlivem snížení teploty na 50-65 °C (Clark & Pazdernik 2013). Poslední krok se nazývá elongace, jinak řečeno prodlužování primerů. Elongace se odehrává při teplotě 75-80 °C, během kterých dochází k syntéze DNA, a to díky enzymu DNA polymeráza. V průběhu syntézy DNA přirůstá komplementární vlákno DNA k původní molekule DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci. Tyto cykly se vícekrát opakují, obvyklý počet opakování se pohybuje mezi 30-35 (Barnes 1994).



Obrázek 5 Polymerázová řetězová reakce (upraveno dle Britannica, The Editors of Encyclopædia 2021).

3.4 Škrob

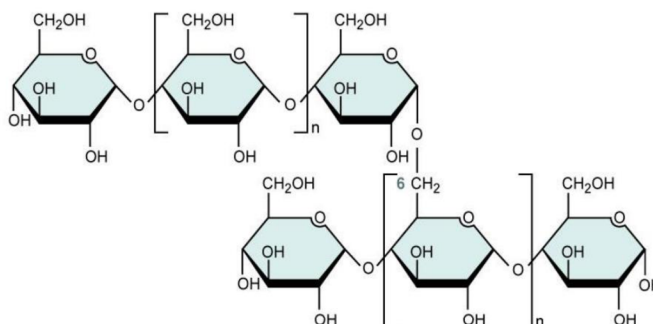
Škrob je zásobní polysacharid rostlin. Vytváří se v membráně a je součástí plastidů. V rostlinách slouží jako pohotovostní zásoba glukosy (Tester et al. 2004). Jedná se o směs dvou polysacharidů, amylopektinu a amylosy. Jejich základní jednotkou je D-glukopyranosa. Zastoupení amylosy a amylopektinu ve škrobu je odlišné v závislosti na vegetačním stadiu rostliny a botanickém původu rostliny (Werij et al. 2012). Kromě polysacharidických látek škroby obsahují i malé množství látek průvodních, mezi které patří proteiny, lipidy a 10-20 % vody. Mezi hlavní zdroje škrobu patří brambory, rýže, kukuřice a pšenice. Z výživového hlediska řadíme škrob mezi hlavní energetické zdroje potravin (Singh & Kaur 2016).

Škrob se nachází ve všech částech rostlin, avšak technologicky nejvýznamnější je škrob nacházející se v hlízách nebo semenech. Mezi nimi je podstatný rozdíl, neboť škrob uložený v hlízách, například škrob bramborový, se vyskytuje v materiálu s převažujícím obsahem vody. Proto jsou tato zrna velká, nakypřená a polydisperzní. Naproti tomu škrob obsažený v zrnech, kukuřičný anebo pšeničný, je většinou drobný a monodisperzní (Singh & Kaur 2009). Velikost škrobových zrn se pohybuje mezi 1 a 110 μm . Pro průmyslové využití je nejdůležitější škrob bramborový následovaný škrobem kukuřičným a pšeničným (Bach et al. 2013).

3.4.1 Amylopektin

Amylopektin (Obrázek 6) má větší molekulu než amylosa. Větví se zhruba po dvaceti glukosových jednotkách, přičemž vytváří jakýsi stromeček (Svegmarm et al. 2002). Pro amylopektin jsou typické glykosidové vazby α -1-6. Výjimečně se u něj vyskytují vazby α (1,3), kdy stavební jednotkou je laminaribosa. Vyskytuje se v něm i malé množství (0,17 %) esterově vázané kyseliny fosforečné. Amylopektin tvoří v roztoku klubičko. Ve vodě je nerozpustný. Amylopektin se po přidání jodu obarví na fialovo (Velíšek & Hajšlová 2009).

Amylopektin má vyšší relativní molekulovou hmotnost než amylosa. Kompletní molekulová hmotnost amylopektinu činí zhruba 2 miliony glukosových jednotek, díky čemuž se řadí mezi největší přírodní makromolekuly (Svegmarm et al. 2002).



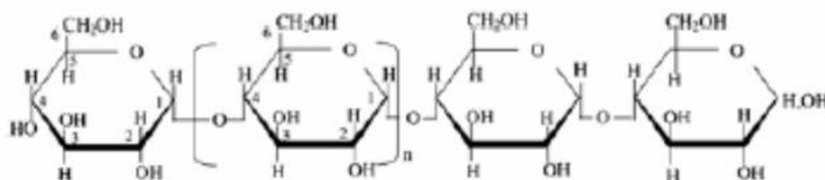
Obrázek 6 Schematické znázornění amylopektinu (Velíšek & Hajšlová 2009).

3.4.2 Amylosa

Amylosa (Obrázek 7) se skládá z několika set molekul glukosy, které jsou spojeny vazbou α -1-4. Písmeno α udává v tomto případě polohu sousedících glukosových jednotek (Singh &

Kaur 2009). Číslice 1-4 pak vyjadřuje pozici hydroxilů, mezi kterými se vazba uskutečňuje. Molekula amylosy má tvar spirály. Do nitra této šroubovice je možno navázat až 20 % jodu, čehož je využíváno při důkazech škrobu v analytické chemii (Velíšek & Hajšlová 2009).

Relativní molekulová hmotnost amylosy se pohybuje v rozmezí od 16 tisíc do 1 milionu. Průměrný obsah amylosy ve škrobech je 20-25 %, ale její obsah kolísá v rozmezí 0-75 % (Lauro et al. 1999). Ve vodě se amylosa rozpouští na málo viskózní, čirý roztok. Následkem retrogradace je po čase z roztoků vylučována (Velíšek & Hajšlová 2009).



Obrázek 7 Schématické znázornění amylosy (Lauro et al. 1999).

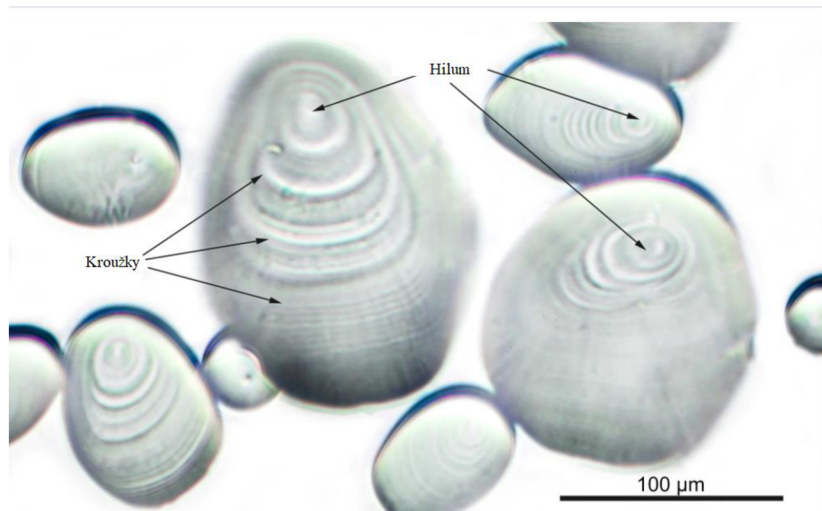
3.4.3 Bramborový škrob

U bramborového škrobu činí poměr amylosy k amylopektinu zhruba 1:4 (Werij et al. 2012). Škrob bramborové hlízy se skládá z 75 % amylopektinu, 21 % amylosy, 0,1 % proteinu a z 0,08 % fosforu (Singh & Kaur 2009). Škrob je považován za hlavní složku bramborové hlízy, neboť zaujímá 10–15 % z její hmotnosti. V sušině bramborové hlízy se nachází 65-85 % škrobu (Singh & Kaur 2016).

Zrna bramborového škrobu mají oválný, vejčitý až lasturnatý tvar. Je na nich zřetelné rýhování a mají excentricky umístěné jádro (Obrázek 8). Měrná hmotnost tohoto škrobu činí 1,648. Čím je zrno větší, tím je také těžší a rychleji sedimentuje (Dudáš et al. 1981). Bramborový škrob je bílého zbarvení. Jedná se o jemný sypký prášek s neutrální vůní a chutí (Singh & Kaur 2016).

10 % celkové produkce škrobu se v České republice vyrábí z brambor. I přesto se jedná o nepostradatelnou součást českého škrobářenského průmyslu. Brambory určené pro výrobu škrobu jsou pěstovány v České republice na cca pěti tisících hektarech. Tyto brambory jsou pěstovány především v Jihočeském a Jihomoravském kraji a v kraji Vysočina. Na území České republiky jsou v současné době jen dva výrobci škrobu z brambor, a to Škrobárny Pelhřimov, a.s. a LYCKEBY AMYLEX, a.s. Horažďovice (Žižka 2020).

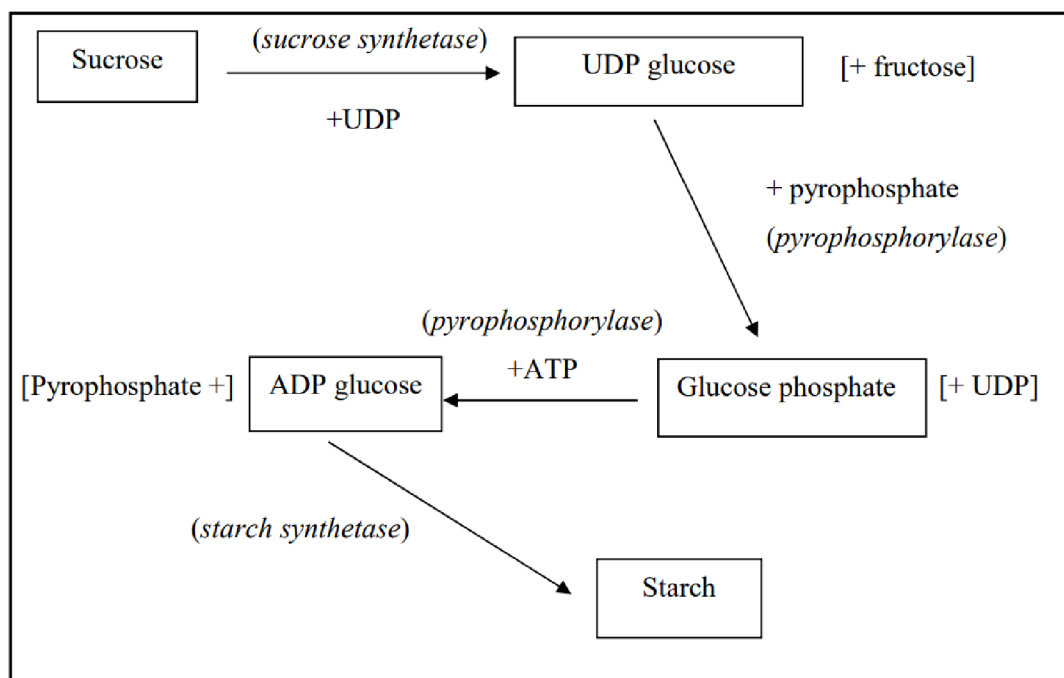
Bramborový škrob se užívá v potravinářském průmyslu. Je znám pod názvem solamyl, který se v domácnostech běžně využívá pro přípravu drobného pečiva, moučníků anebo pro zahušťování pokrmů, čehož mohou využívat lidé trpící celiakií, neboť tento škrob neobsahuje lepek. Bramborový škrob je dále používán v textilním průmyslu, v papírenském průmyslu anebo ve stavebnictví (Stasiak et al. 2011).



Obrázek 8 Bramborový škrob (Berdan 2021).

3.4.4 Biosyntéza škrobu

Biosyntéza škrobu probíhá v amyloplastech a chloroplastech. Zabudování sacharózy do škrobu je způsobeno řadou reakcí (Obrázek 9). Mezi prekurzory škrobu patří adenzindifosfátglukosa. Enzym ADP-glukosapyrofosforylasa katalyzuje tvorbu adenzindifosfátglukosy z glukosa-1-fosfátu a ATP (Singh & Kaur 2009). Výhradním prekurzorem biosyntézy škrobu je ADP-glukosa. Obsah škrobu v hlízách je tím vyšší, čím delší je období, během kterého se může tvořit a ukládat škrob a také čím je kratší období tvorby zásobních pletiv sloužících pro ukládání škrobu. Látky, které jsou během vývoje hlíz potřeba v amyloplastech jsou pyrofosforylasa, ADP-glukosa, enzymy větveného škrobu, enzymy nevětveného škrobu a syntéza škrobu (Bansal et al. 2012).



Obrázek 9 Biosyntéza škrobu (Burton 1989).

3.4.5 Trávení škrobu

Trávení škrobu počíná v ústech, a to díky účinku slinné α -amylasy, kterou nazýváme také ptyalin. Doba působení ptyalinu je však krátká, proto je význam trávení škrobu slinnou

α -amylasou velmi malý. Zažívatina pak dále putuje trávicím traktem. Největší význam pro trávení škrobu má tenké střevo, a to díky účinku pankreatické α -amylasy. Jedná se o amylasu dextrogenní, což znamená, že štěpí molekuly amylopektinu a amylosy uprostřed řetězce nejprve za vzniku dextrinů, a nakonec za vzniku maltosy (Heldt et al. 2011). Disacharidy maltosa a isomaltosa, jež se vyskytují především ve střevní šťávě, dokončují hydrolyzu škrobu. V hraničním dextrinu, což je zbytek po štěpení amylopektinu, štěpí isomaltosa vazby α -1-6. V maltose a maltotriose štěpí maltosa vazby α -1-4. Výsledným produktem trávení škrobu je glukosa, jež je rychle vstřebávána díky aktivnímu transportu. Amylosa se v lidském trávicím traktu tráví déle než amylopektin. Hladina krevního cukru je tedy nižší po jídle, které má vysoký obsah amylosy (Stawski 2008).

3.4.6 Resistentní škrob

Resistentní škrob je škrob, který odolává trávení v tenkém střevu. Účinky resistentního škrobu v tlustém střevě jsou podobné účinkům vlákniny. Resistentní škrob slouží v tlustém střevu jako substrát pro mikroorganismy. Přítomnost tohoto škrobu v lidském organismu je zdraví prospěšná. Má mnoho žádoucích fyziologických účinků, jako je zvýšení objemu stolice anebo zkracování průchodu potravy trávicím traktem (Kingman & Englyst 1994).

Resistentní škrob (RS) je možno rozdělit do čtyř skupin. Prvním typem resistentního škrobu, tedy RS1 je škrob fyzicky nepřístupný pankreatické amylase. Jedná se o škrob nacházející se v semenech nebo nedostatečně rozdrčených zrnech. RS2 je škrobem kukuřice a syrových brambor, které mají vysoký obsah amylosy. RS3 je škrob, který vzniknul retrogradací, což je ochlazení po předchozím zahřátí. Vyskytuje se kupříkladu ve starém pečivu. RS4 vzniknul chemickou úpravou. Jedná se například o hydroxymethylškrob. Celkově platí, že škroby mající vysoký obsah amylosy bývají odolnější vůči amylasám, než škroby mající vysoký obsah amylopektinu (Berry 1986).

3.4.7 Degradace škrobu

Degradace škrobu patří mezi důležité procesy odehrávající se v rostlinách. Vyskytuje se zejména v orgánech rostlin majících přebytek škrobu, jako jsou kupříkladu bramborové hlízy. Při skladování bramborových hlíz je z celkového obsahu škrobu část škrobu degradována, přičemž dochází k uvolnění cukru pro dýchání (Fajardo et al. 2013). Během skladování bramborových hlíz se mohou na jejich povrchu vytvářet mělké zářezy, což značí erodující granule. K degradaci škrobu může dojít hydrolyticky, tedy s použitím enzymů α -amylázy nebo β -amylázy, anebo fosforolyticky díky fosforylázám škrobu (Singh & Kaur 2009).

3.4.8 Fosforylace bramborového škrobu

Fosforylace škrobu je v metabolismu rostlin důležitá zejména kvůli degradaci škrobu. Mezi nejčastější formu škrobu patří mírně fosforylovaná forma, která obsahuje fosfátové skupiny monoesterifikovaných glukózových zbytků (Singh & Kaur 2016). Fyzikálně-chemické

vlastnosti škrobu určuje stupeň fosforylace škrobu. Pokud se ve škrobu nachází fosfátové estery, zvyšuje se i jeho hydratace. Fosforylace škrobu má vliv na viskozitu konečných produktů a brání krystalizaci (Sung et al. 2005).

3.4.9 Škrobnatost

Škrobnatost je vlastnost bramboru, která se bere v úvahu především při hodnocení brambor ze škrobárenského hlediska. Uvádí se v procentech z čerstvé hmotnosti hlíz. Optimální škrobnatost brambor by měla činit 18-20 %. Obsah škrobu v hlízách se zvyšuje v průběhu vegetace dle podmínek růstu. Ve fázi fyziologické zralosti hlíz dosahuje obsah škrobu svého maxima. Odrůdy brambor se dle obsahu škrobu rozdělují do několika skupin, které podléhají jinému zpracování. Některé odrůdy brambor jsou tak díky obsahu škrobu vhodné pro výrobu škrobu, jiné pro výrobu bramborových hranolek, prášku či lupínek (Čermák 2021).

3.4.10 Analýza škrobu

Analýza škrobu nejprve předchází vyextrahování škrobu z brambor. Škrob je možno izolovat jak ze sušiny brambor, tak i z čerstvých hlíz. Při izolaci bramborového škrobu dochází ke strouhání brambor. Pomocí odstředivky se pak rozdělí třenka na tekutou a tuhou část. Tuhá část je poté vypírána, aby došlo k oddělení škrobu, jenž byl uvolněn poškozením buněk bramboru během strouhání (Singh & Kaur 2009). Následuje oddělení škrobu, jeho předsoušení a sušení. Pro zjištění složek škrobu, tedy pro zjištění amylosy a amylopektinu, je užíváno několika metod, mezi něž patří infračervená spektroskopie, vysoce výkonná vylučovací chromatografie anebo enzymatická metoda, tato metoda je však příliš drahá a časově náročná (Stawski 2008).

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Pro detekci polymorfismu DNA markerů byla k dispozici DNA izolovaná ze 153 odrůd bramboru obecného (*Solanum tuberosum* L.) s různým potravinářským využitím. Biologický materiál byl získán ve spolupráci s VÚB Havlíčkův Brod s.r.o.

4.2 Izolace DNA

DNA byla izolována z listových čepelí pomocí komerčního kitu pro extrakci rostlinné DNA od firmy Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit), kdy bylo postupováno dle protokolu od výrobce.

Protokol od výrobce

1. Vzorky (100 mg čerstvé hmoty listů) byly ve zkumavce o objemu 2 ml zmrazeny pomocí tekutého dusíku a rozmělněny.
2. Do každé zkumavky bylo přidáno 400 μ l pufru AP1 a 4 μ l RNázy A. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány po dobu 10 min při teplotě 65 °C. V průběhu inkubace byla zkumavka 3x obrácena.
3. Bylo přidáno 130 μ l pufru P3. Zkumavky byly promíchány a inkubovány po dobu 5 minut na ledu.
4. Lyzát byl centrifugován po dobu 5 minut při 20 000 \times g (14 000 rpm).
5. Lyzát byl napipetován do kolonky QIAshredder, jež byla umístěna ve 2 ml sběrné zkumavce a následně byl centrifugován po 2 minuty při 20 000 \times g.
6. Vzorek byl přenesen do jiné zkumavky, bylo přidáno 1,5 pufru AW1 a promícháno pipetováním.
7. 650 μ l směsi bylo přeneseno do centrifugační kolonky DNeasy Mini, která byla umístěna ve 2 ml sběrné zkumavce. Směs byla centrifugována 1 minutu při 6 000 \times g. Tento krok byl opakován se zbývajícím vzorkem.
8. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky. Bylo přidáno 500 μ l pufru AW2 a centrifugováno 1 minutu při 6 000 \times g.
9. Bylo přidáno dalších 500 μ l pufru AW2. Bylo centrifugováno 2 min při 20 000 g.
10. Kolonka byla přenesena do nové 2 ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Bylo přidáno 100 μ l pufru AE pro eluci. Bylo inkubováno 5 minut při pokojové teplotě (15-25 °C). Bylo centrifugováno 1 minutu při 6 000 \times g.
12. Krok 11 byl opakován.

Po izolaci DNA byla stanovena čistota a koncentrace vzorků pomocí spektrofotometru značky Implen.

4.3 Primery

Pro tento pokus byly použity primery navržené pro mikrosatelitní DNA bramboru. Každá reakce obsahovala od každého z markerů dva protichůdné primery, tedy jeden primer forwardový (F, vlákno 5'-3') a jeden primer reverzní (R, vlákno 3'-5').

4.3.1 Charakteristika markerů

Vzorky DNA bramboru byly testovány panelem vybraných mikrosatelitních markerů dle studií od Milbourne et al. (1998), Feingold et al. (2005), Ghislain et al. (2009) a Sedlák et al. (2022). PCR reakce 17 jaderných mikrosatelitních SSR markerů byla optimalizována v podobě tří multiplexů. Charakteristika těchto multiplexů se nachází v následujících Tabulkách 4-6. Genetická SSR mapa brambor zahrnující 24 SSR markerů se pak nachází na Obrázku 10.

Tabulka 4 Charakteristika markerů – multiplex 1

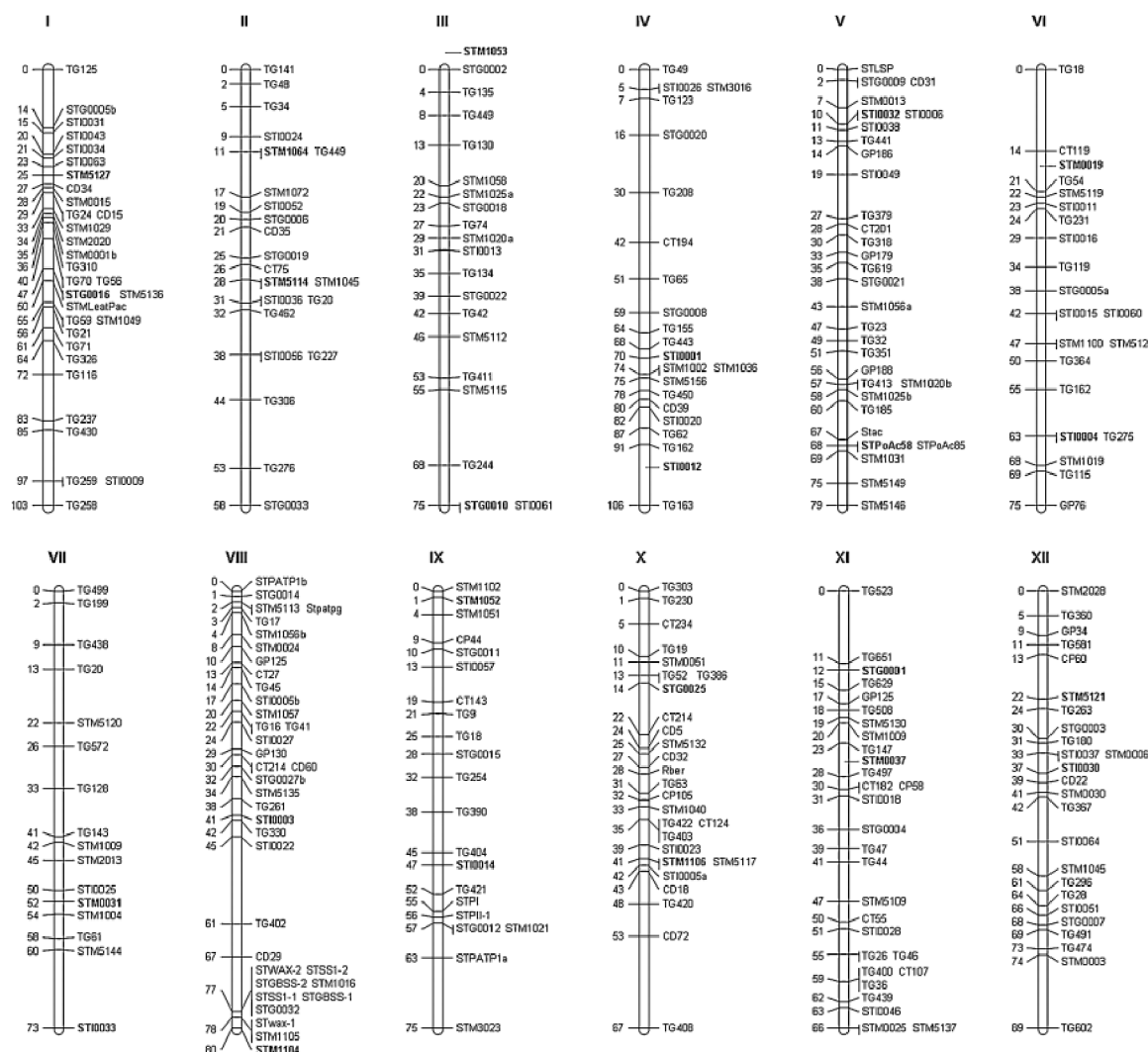
Název markeru	Barevné značení	Sekvence primerů	Počet zjištěných alel	Rozpětí alel (bp)	Umístění chromozomu	Opakující se motiv
STG0001 (Ghislain et al. 2009)	6-FAM	F: CAgCCAACATTgTACCCCT R: ACCCCCACTTgCCATATTTT	12	119-139	XI	(CT) _n
STG0010 (Ghislain et al. 2009)	6-FAM	F: CgATCTCTgCTTTgCAggTA R: gTTCATCACTACCgCCgACT	6	153-163	III	(TG) _n
STI0012 (Feingold et al. 2005)	VIC	F: gAAgCgACTTCCAAAATCAgA R: AAAgggAggAATAgAAACCAAAA	10	160-192	IV	(ATT) _n
STM1052 (Milbourne et al. 1998)	PET	F: CAATTCgTTTTTTCATgTgACAC R: ATggCgTAATTTgATTTAATACgTAA	11	195-252	IX	(AT) _n GT (AT) _n (GT) _n
STM1064 (Milbourne et al. 1998)	NED	F: gTTCTTTTggTggTTTTCTT R: TTATTTCTCTgTTgTTgTTgCTg	7	184-191	II	(TA) _n (TG) _n GT(TG) _n
STM1104 (Milbourne et al. 1998)	PET	F: TgATTCTCTTgCCTACTgTAATCg R: CAAAgTggTgTgAAgCTgTgA	7	164-176	VIII	(TCT) _n

Tabulka 5 Charakteristika markerů – multiplex 2

Název markeru	Barevné značení	Sekvence primerů	Počet zjištěných alel	Rozpětí alel (bp)	Umístění chromozomu	Opakující se motiv
STM0031 (Milbourne et al. 1998)	6-FAM	F: CATAcGCACGCACGTACAC R: TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCCG	9	136-300	VII	(AC) _n ...(AC) _n GCAC(AC) _n (GCAC) _n
STM5114 (unpublished from SCRI in Ghislain et al. 2009)	6-FAM	F: AATGGCTCTCTGTATGCT R: GCTGTCCCACTATCTTTGA	6	278-300	II	(ACC) _n
STM0019 (Milbourne et al. 1998)	VIC	F: AATAGGTGTACTGACTCTCAATG R: TTGAAGTAAAAGTCTAGTATGTG	9	161-229	VI	(AT) _n (GT) _n (AT) _n (GT) _n (GC) _n (GT) _n
STI0033 (Feingold et al. 2005)	NED	F: TGAGGGTTTTTCAGAAAGGGA R: CATCTTGCAACAACCTCCT	7	109-130	VII	(AGG) _n
STI0003 (Feingold et al. 2005), (Sedlák et al. 2022)	PET	F: ACCATCCACCATGTCAATGC R: GTTTCTTCATTGGGCTCATTGGAGGA	6	124-150	VIII	(ACC) _n

Tabulka 6 Charakteristika markerů – multiplex 3

Název markeru	Barevné značení	Sekvence primerů	Počet zjištěných alel	Rozpětí alel (bp)	Umístění chromozomu	Opakující se motiv
STI0014 (Feingold et al. 2005)	6-FAM	F: AgAAACTgAgTTgTgTTTgggA R: TCAACAgTCTCAgAAAACCTCT	6	114-127	IX	(TGG) _n (AGG) _n
STI0032 (Feingold et al. 2005)	VIC	F: TgggAAgAATCCTgAAATgg R: TgCTCTACCAATTAACggCA	8	107-125	V	(GGA) _n
STI0004 (Feingold et al. 2005)	NED	F: GCTgCTAAACACTCAAgCAgAA R: CAACTACAAgATTCCATCCACA	10	69-99	VI	(AAG) _n
STM1053 (Milbourne et al. 1998)	NED	F: TCTCCCCATCTTAATgTTTC R: CAACACAgCATACAgATCATC	4	158-169	III	(TA) _n (ATC) _n
STMS127 (unpublished from SCRI in Ghislain et al. 2009)	VIC	F: TTCAAgAATAggCAAAACCA R: CTTTTTCTgACTgAgTTgCCTC	9	233-267	I	(TCT) _n
STG0016 (Ghislain et al. 2009)	PET	F: AgCTgCTCAgCATCAAgAgA R: ACCACCTCAggCACTTCATC	11	119-156	I	(AGA) _n



Obrázek 10 Genetická SSR mapa brambor zahrnující 17 v této práci analyzovaných SSR markerů (Ghislain et al. 2009).

4.4 Příprava PCR

PCR reakce byla provedena v přístroji Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad) při nastavení uvedeném v Tabulce 7. Složení reakčních směsí se nachází v Tabulkách 8-10, před napipetováním do mikrozkušavek byl každý komponent zvortexován.

Tabulka 7 Souhrn časů a teplot během PCR

Reakce	Teplota	Čas	Opakování
Predenaturace	95 °C	10 min	1 x
Denaturace	94 °C	30 s	
Annealing	56 °C	90 s	35 x
Elongace	72 °C	60 s	
Konečná elongace	60 °C	80 min	1 x

Tabulka 8 Složení reakční směsi pro multiplex 1 o celkovém objemu 10 μ l, zásobní roztoky jednotlivých primerů měly koncentraci 4 μ M.

Komponenta	Pipetovaný objem	Finální koncentrace v reakci
DNA	1 μ l	5 ng
MasterMix	5 μ l	
dd H ₂ O	0,2 μ l	
STG0001 F	0,3 μ l	0,12 μ M
STG0001 R	0,3 μ l	0,12 μ M
STG0010 F	0,4 μ l	0,16 μ M
STG0010 R	0,4 μ l	0,16 μ M
STI0012 F	0,2 μ l	0,08 μ M
STI0012 R	0,2 μ l	0,08 μ M
STM1064 F	0,3 μ l	0,12 μ M
STM1064 R	0,3 μ l	0,12 μ M
STM1104 F	0,3 μ l	0,12 μ M
STM1104 R	0,3 μ l	0,12 μ M
STM1052 F	0,4 μ l	0,16 μ M
STM1052 R	0,4 μ l	0,16 μ M

Tabulka 9 Složení reakční směsi pro multiplex 2 o celkovém objemu 10 μl , zásobní roztoky jednotlivých primerů měly koncentraci 4 μM .

Komponenta	Objem	Koncentrace
DNA	1 μl	5 ng
MasterMix	5 μl	
dd H ₂ O		
STM0031 F	0,3 μl	0,12 μM
STM0031 R	0,3 μl	0,12 μM
STM5114 F	0,3 μl	0,12 μM
STM5114 R	0,3 μl	0,12 μM
STM0019 F	0,5 μl	0,2 μM
STM0019 R	0,5 μl	0,2 μM
STI0033 F	0,2 μl	0,08 μM
STI0033 R	0,2 μl	0,08 μM
STI0003 F	0,5 μl	0,2 μM
STI0003 R	0,5 μl	0,2 μM

Tabulka 10 Složení reakční směsi pro multiplex 3 o celkovém objemu 10 μl , zásobní roztoky jednotlivých primerů měly koncentraci 4 μM .

Komponenta	Pipetovaný objem	Finální koncentrace v reakci
DNA	1 μl	5 ng
MasterMix	5 μl	
dd H ₂ O	1,1 μl	
STI0014 F	0,3 μl	0,12 μM
STI0014 R	0,3 μl	0,12 μM
STI0032 F	0,15 μl	0,06 μM
STI0032 R	0,15 μl	0,06 μM
STI0004 F	0,3 μl	0,12 μM
STI0004 R	0,3 μl	0,12 μM
STM1053 F	0,2 μl	0,08 μM
STM1053 R	0,2 μl	0,08 μM
STM5127 F	0,2 μl	0,08 μM
STM5127 R	0,2 μl	0,08 μM
STG0016 F	0,3 μl	0,12 μM
STG0016 R	0,3 μl	0,12 μM

4.5 Příprava vzorků pro kapilární elektroforézu

Po skončení PCR byl každý vzorek DNA naředěn v poměru 1:29 destilovanou vodou a promíchán pomocí 20 µl pipety. Do vzorku bylo dále přidáno 12,2 µl hmotnostního standardu Hi-Di-Liz sestávajícího se z 0,2 µl hmotnostního standardu GeneScan-600Liz a z 12 µl denaturačního činidla Hi-Di. Před kapilární elektroforézou došlo k denaturaci vzorků, která probíhala v přístroji Biometra Thermocycler T-Gradient při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Zdenaturované vzorky byly poté analyzovány pomocí kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Parametry elektroforézy byly: 36 cm dlouhá kapilára; nástřik 8 s při 15 kV; vlastní separace 24 min při 15 kV.

4.6 Statistické zpracování dat

Data z kapilární elektroforézy ABI PRISM 310 Genetic Analyzer s programem 310 Data Collection Software byla zpracována a analyzována softwarem GeneMapper 4.1. od výrobce Applied Biosystems. Pro rozřídění a zpracování alelických dat ze SSR markerů byl použit MS Excel 2016. Všechna alelická data byla poté převedena na binární čísla, tedy na 0 v případě absence dané alely a na 1 v případě přítomnosti dané alely. Všechna data byla následně vyhodnocena shlukovou analýzou v programu DARwin 6.0.21., který je volně stažitelný z <https://darwin.cirad.fr/product.php>. Pro analýzu podobnosti byl použit Jaccardův koeficient, který slouží k porovnávání podobnosti mezi dvěma soubory dat za základě shody hodnot na jistých pozicích (Niwattanakul et al. 2013). Mechanismus Jaccardova koeficientu lze vyjádřit následující rovnicí (Obrázek 11).

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

Obrázek 11 Rovnice vyjadřující Jaccardův koeficient (Niwattanakul et al. 2013).

Dále bylo počítáno s 1000 bootstrapy. Bootstrap je možné popsat jako metodu odhadu pomocí opakovaného výběru dat (Horowitz 2005). Jako metoda byla zvolena UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean), což lze přeložit jakožto metoda neváženého párování s aritmetickým průměrem. Jedná se o jednoduchou hierarchickou shlukovou metodu (Sokal & Mechener 1958).

Na základě celkových alelických dat a dále na základě jednotlivých SSR markerů byly jako výstupy v programu DARwin 6.0.21 vytvořeny dendogramy. Alelický profil odrůd vycházející z těchto dendogramů byl posléze porovnán s ostatními odrůdami i s obsahem škrobu v bramborové hlíze u jednotlivých odrůd. U odrůd se shodou v alelickém profilu byla v některých případech vyhledána příbuznost v rodokmenech nalezených v Evropské pěstitelské databázi Europotato (europotato.org). Odrůdy také byly tříděny dle místa původu, které bylo zjištěno v databázi výzkumného ústavu rostlinné výroby (grinczech.vurv.cz).

Pro každou ze 153 odrůd bramboru byla v databázi výzkumného ústavu rostlinné výroby (grinczech.vurv.cz) zjištěna data o škrobnatosti. Data o škrobnatosti byla v databázi Grinczech hodnocena devítibodovou stupnicí. Ke každé odrůdě byla nalezena příslušná hodnota škrobu a k ní náležící procentuální hodnocení. Pro účely tvorby dendogramů byla tato stupnice dále zredukována na tři obsahové kategorie.

5 Výsledky

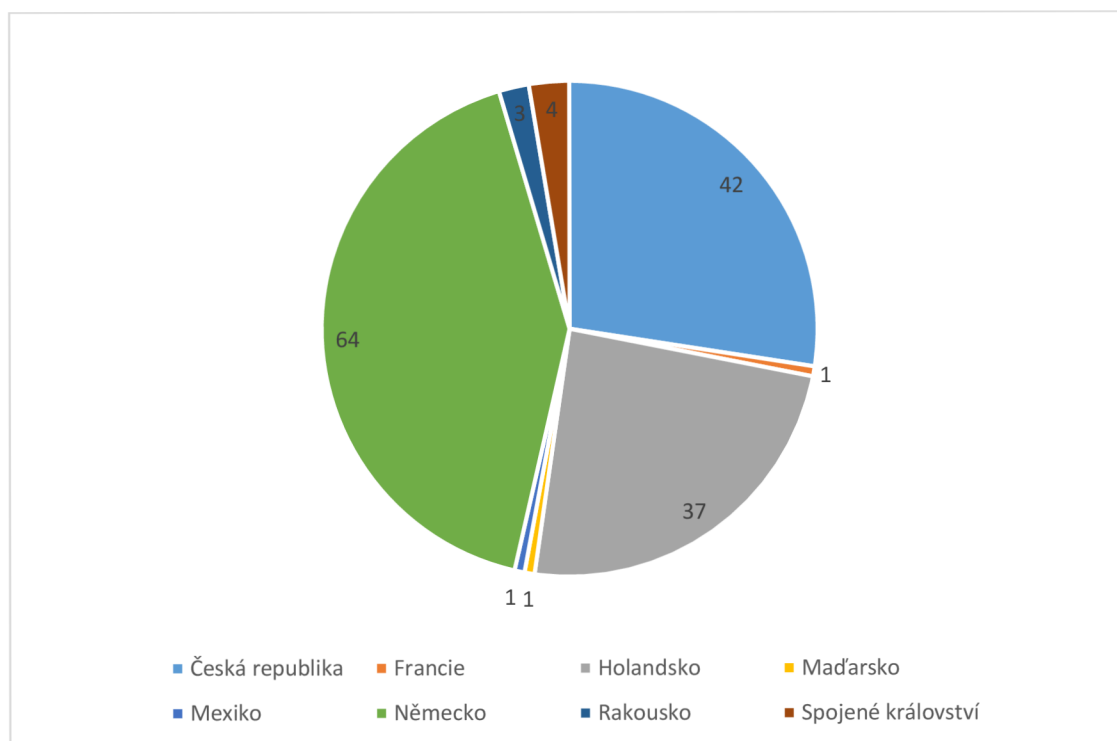
5.1 Charakteristika hodnocených odrůd brambor

5.1.1 Země původu jednotlivých odrůd

Hodnocené odrůdy pocházely celkem z osmi zemí, jejichž rozpis se nachází v Tabulce. Z Tabulky 11 vyplývá výšečový graf (Obrázek 12), který udává zastoupení odrůd dle místa původu.

Tabulka 11 Porovnání země původu odrůd s průměrným obsahem škrobu.

Země původu	Počet odrůd	Průměrný obsah škrobu
Česká republika	42	4,0405
Francie	1	4
Holandsko	37	4,0392
Maďarsko	1	4
Mexiko	1	4
Německo	64	4,0667
Rakousko	3	3
Spojené království	4	3,5



Obrázek 12 Výšečový graf - zastoupení odrůd dle místa původu.

5.2 Alely hodnocených odrůd

Pro roztřídění a zpracování alelických dat z analýz SSR markerů byl použit MS Excel 2016, ve kterém vznikla Tabulka 12 udávající, kolikrát se jaká alela vyskytla ve kterém markeru.

Tabulka 12 Četnost jednotlivých alel.

Multiplex	Marker	Alela (velikost bp)	Četnost
1	STG0001	119	1
1	STG0001	122	26
1	STG0001	124	81
1	STG0001	126	11
1	STG0001	127	7
1	STG0001	128	2
1	STG0001	129	20
1	STG0001	131	3
1	STG0001	132	89
1	STG0001	135	80
1	STG0001	137	5
1	STG0001	139	102
1	STG0010	153	1
1	STG0010	154	82
1	STG0010	157	13
1	STG0010	159	136
1	STG0010	161	124
1	STG0010	163	2
1	STI0012	160	95
1	STI0012	163	85
1	STI0012	166	1
1	STI0012	167	90
1	STI0012	169	46
1	STI0012	172	1
1	STI0012	179	100
1	STI0012	182	10
1	STI0012	185	6
1	STI0012	192	2
1	STM1064	184	152
1	STM1064	186	1
1	STM1064	187	85
1	STM1064	188	3
1	STM1064	189	46
1	STM1064	190	7
1	STM1064	191	6
1	STM1104	164	16
1	STM1104	167	126
1	STM1104	168	8
1	STM1104	170	3
1	STM1104	171	107
1	STM1104	174	12

1	STM1104	176	11
1	STM1052	195	1
1	STM1052	206	21
1	STM1052	207	101
1	STM1052	215	39
1	STM1052	223	90
1	STM1052	224	8
1	STM1052	235	14
1	STM1052	246	2
1	STM1052	248	50
1	STM1052	250	3
1	STM1052	252	6
2	STM0031	136	4
2	STM0031	142	12
2	STM0031	146	1
2	STM0031	148	70
2	STM0031	164	74
2	STM0031	174	3
2	STM0031	182	84
2	STM0031	184	65
2	STM0031	300	1
2	STM5114	278	39
2	STM5114	281	28
2	STM5114	284	108
2	STM5114	287	47
2	STM5114	293	147
2	STM5114	300	8
2	STM0019	161	3
2	STM0019	175	1
2	STM0019	183	2
2	STM0019	187	72
2	STM0019	191	2
2	STM0019	192	32
2	STM0019	198	12
2	STM0019	202	102
2	STM0019	229	65
2	STI0033	109	139
2	STI0033	112	1
2	STI0033	115	70
2	STI0033	118	9
2	STI0033	121	29
2	STI0033	127	114
2	STI0033	130	74
2	STI0003	124	59
2	STI0003	133	139
2	STI0003	141	118
2	STI0003	145	20
2	STI0003	147	25
2	STI0003	150	1
3	STG0016	119	1

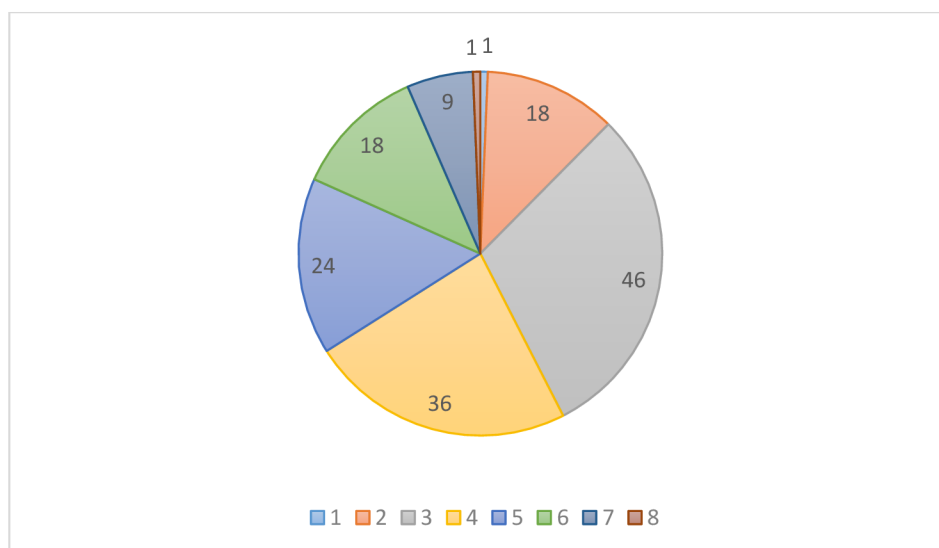
3	STG0016	121	1
3	STG0016	122	1
3	STG0016	125	73
3	STG0016	130	35
3	STG0016	133	115
3	STG0016	136	127
3	STG0016	141	3
3	STG0016	150	1
3	STG0016	154	82
3	STG0016	156	2
<hr/>			
3	STI0004	69	10
3	STI0004	72	127
3	STI0004	75	28
3	STI0004	78	4
3	STI0004	81	1
3	STI0004	84	36
3	STI0004	87	1
3	STI0004	90	78
3	STI0004	96	97
3	STI0004	99	4
<hr/>			
3	STI0014	114	4
3	STI0014	118	134
3	STI0014	120	3
3	STI0014	123	83
3	STI0014	126	125
3	STI0014	127	3
<hr/>			
3	STI0032	107	103
3	STI0032	110	25
3	STI0032	113	3
3	STI0032	115	5
3	STI0032	116	44
3	STI0032	119	120
3	STI0032	122	115
3	STI0032	125	48
<hr/>			
3	STM1053	158	2
3	STM1053	164	44
3	STM1053	168	153
3	STM1053	169	1
<hr/>			
3	STM5127	233	30
3	STM5127	236	118
3	STM5127	239	1
3	STM5127	242	9
3	STM5127	245	42
3	STM5127	248	1
3	STM5127	252	2
3	STM5127	265	48
3	STM5127	267	29

5.3 Odrůdové zastoupení brambor

V analyzovaném souboru je zastoupeno celkem 153 odrůd brambor. Tyto brambory mají různé potravinářské využití. Hlavním faktorem, který o potravinářském využití brambor rozhoduje, je škrobnatost, která se uvádí v procentech v původní hmotě. Právě na škrobnatosti závisí využitelnost odrůd pro zpracování na škrob, lupínky, hranolky či suché výrobky. Tabulka 13 zobrazuje označení škrobu, jež bylo pro každou z testovaných odrůd nalezeno v databázi výzkumného ústavu rostlinné výroby (grinczech.vurv.cz). Tabulka 13 pak vysvětluje i číselný údaj hodnoty škrobu v procentech. Z dat uvedených v Tabulce 13 byl vytvořen výšečový graf (Obrázek 13).

Tabulka 13 Četnost výskytu odrůd v hodnoceném souboru dle obsahu škrobu v bramborové hlíze.

Označení škrobu	Hodnota škrobu (%)	Četnost výskytu
1	Pod 10	1
2	10-12	18
3	12,1-14,5	46
4	14,6-16	36
5	16,1-18	24
6	18,1-20	18
7	20,1-22	9
8	22,1-24	1



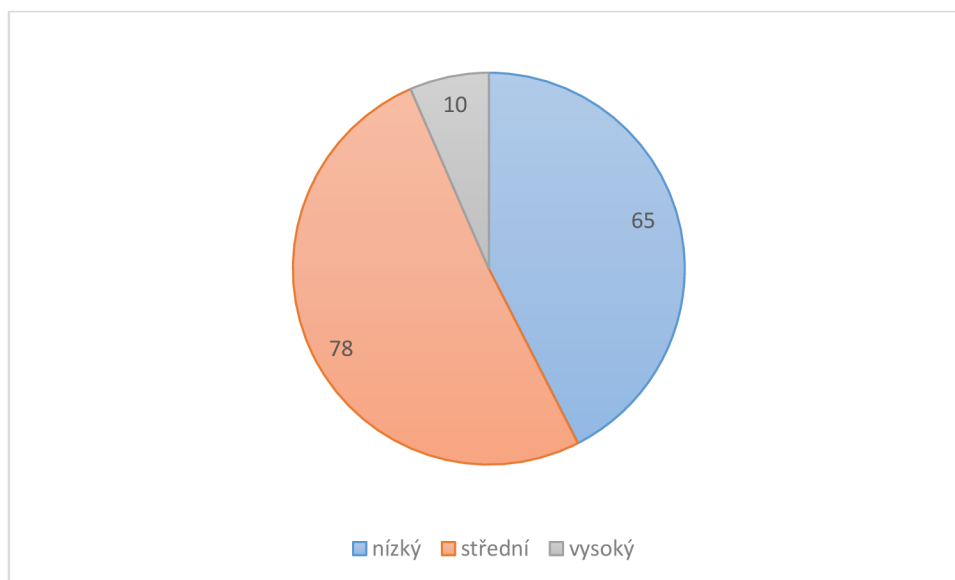
Obrázek 13 Výšečový graf udávající zastoupení odrůd v hodnoceném souboru dle obsahu škrobu v bramborové hlíze.

Pokud by se odrůdy brambor rozdělily podle obsahu škrobu jen na tři kategorie – a to na odrůdy s nízkým obsahem škrobu (odrůdy mající hodnotu škrobu 1-3), odrůdy se středním obsahem škrobu (odrůdy s hodnotou škrobu 4-6) a odrůdy s vysokým obsahem škrobu (odrůdy

s hodnotou škrobu 7-8), pak by Tabulka 14 a následný výsečový graf (Obrázek 14) vypadali následovně:

Tabulka 14 Zastoupení odrůd v této práci podle toho, zda se jedná o brambory s nízkým, středním či vysokým obsahem škrobu.

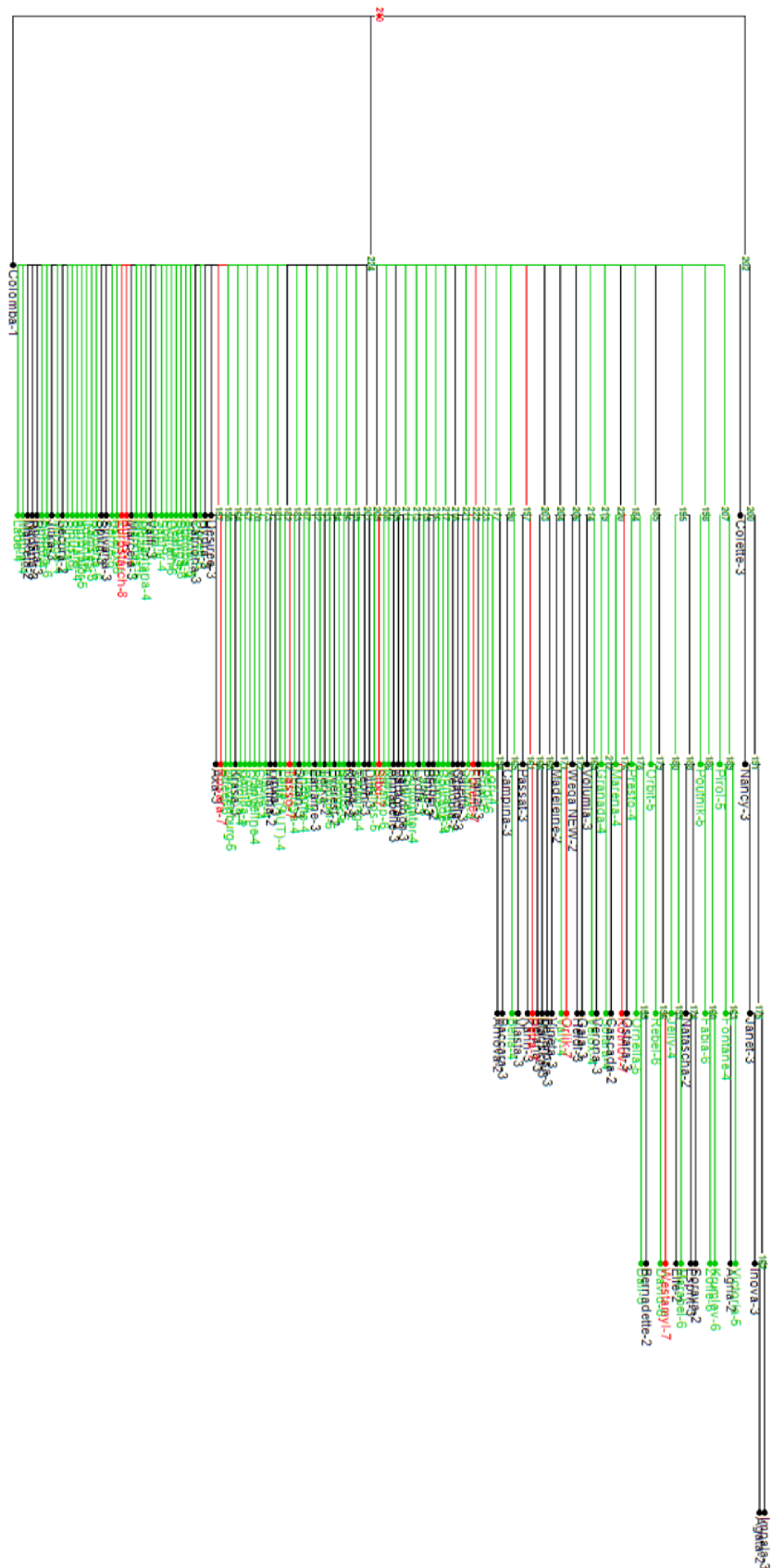
Obsah škrobu	Četnost
Nízký obsah škrobu	65
Střední obsah škrobu	78
Vysoký obsah škrobu	10



Obrázek 14 Výsečový graf udávající zastoupení hodnocených odrůd podle toho, zda se jedná o brambory s nízkým, středním či vysokým obsahem škrobu.

5.4 Dendogramy

Na Obrázku 15 a na obrázcích v přílohách 1-17 jsou zobrazeny dendogramy, které byly vytvořeny v programu DARwin 6.0.21. Tyto dendogramy udávají příbuznost odrůd na základě shody alel. Odrůdy byly zařazeny dle obsahu škrobu do tří barevných značení. Odrůdy s hodnotou škrobu 1-3 jsou vyznačeny černou barvou, odrůdy s hodnotou škrobu 4-6 zelenou barvou a odrůdy s hodnotou škrobu 7-8 pak barvou červenou. Čísla u jednotlivých odrůd pak představují zařazení dané odrůdy do devítibodové stupnice dle obsahu škrobu (Tabulka 13). Příbuznost některých odrůd byla následně porovnána s Evropskou pěstitelskou databází Europotato (europotato.org).



Obrázek 15 Souhrnný dendrogram z DARwin.

Na Obrázku 15 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

6 Diskuze

6.1 Fenotypové hodnocení odrůd

Z Tabulky 13 a výsečového grafu (Obrázek 13) vyplývá, že v této diplomové práci bylo zastoupeno nejvíce odrůd s hodnotou škrobu tři, což znamená, že obsahují 12,1- 14,5 % škrobu (grinczech.vurv.cz). Do této kategorie patří například Axa, Adéla, Annabelle či Barbora, které jsou doporučeny pro přímý konzum jakožto varný typ A nebo B (Čermák 2021). Naopak nejméně početnější jsou odrůdy mající hodnotu škrobu 1 a 8, tedy ty s nejnižším a nejvyšším obsahem škrobu. Odrůdou mající pod 10 % škrobu je zde Colomba (grinczech.vurv.cz). Odrůdou, která má hodnotu škrobu 8 a tím pádem obsah škrobu 22,1-24 %, je Eurostarch. Tato odrůda je pěstována jakožto škrobářská odrůda, tedy za účelem výroby škrobu. Jedná se o vysoce výkonou odrůdu s velmi vysokým výnosem škrobu z jednoho hektaru, který činí 8-12 t škrobu/ha (europlant.cz).

Fenotypové vlastnosti byly dále porovnány se zemí původu odrůd bramboru. Z výsečového grafu (Obrázek 12) lze vyčíst, že nejvíce z odrůd, kterými se zabývá tato práce, bylo vyšlechtěno v Německu, dále v České republice a v Holandsku. Naopak Maďarsko, Mexiko a Francie vyšlechtili pouze po jedné odrůdě z odrůd posuzovaných v této práci. Z Tabulky 11 zase vyplývá, že odrůdy s nejvyšším průměrným obsahem škrobu pocházejí z Německa a odrůdy s nejnižším průměrným obsahem škrobu pocházejí z Rakouska. Průměrný obsah škrobu u odrůd bramboru pocházejících z České republiky činí 4,0405, což udává 14,6-16 % škrobu v bramborové hlíze (grinczech.vurv.cz).

6.2 Vyhodnocení alelického profilu odrůd

Celkem bylo zjištěno 138 alel. V Tabulce 12 se nachází četnost výskytu jednotlivých alel. Z tabulky vyplývá, že nejčetněji se vyskytující alelou v této práci je alela o velikosti 168 bp markeru STM1053, tuto alelu mají všechny z testovaných odrůd bramboru, tedy 153 ze 153. Druhou nejčastější alelou u hodnoceného souboru je alela 184 bp markeru STM1064, kterou disponuje 152 ze 153 odrůd. Tuto alelu nemá pouze odrůda Apta, jejíž obsah škrobu se pohybuje mezi 16,1-18 % (grinczech.vurv.cz). Naopak pouze po jedné se vyskytuje hned několik alel, a to alela 248 (marker STM5127), 239 (marker STM5127), 169 (marker STM1053), 81 (marker STI0004), 150 (marker STG0016), 119 (marker STG0016), 121 (marker STG0016), 122 (marker STG0016), 150 (marker STI0003), 112 (marker STI0033), 175 (marker STM0019), 146 (marker STM0031), 300 (marker STM0031), 195 (marker STM1052), 186 (marker STM1064), 166 (marker STI0012), 172 (marker STI0012), 153 (marker STG0010), 119 (marker STG0001).

Na Obrázku 15 je možno vidět souhrnný dendrogram pro analyzovaný sortiment 153 odrůd, získaný pomocí programu DARwin, na základě shlukování metodou UPGMA všech hodnocených markerů. Díky tomuto dendrogramu můžeme určit příbuznost odrůd na základě shody alel. Z tohoto dendrogramu vychází, že nejpodobnější jsou si díky shodě alel dvě odrůdy, a to odrůda Impala s hodnotou škrobu 3 a odrůda Agáta s hodnotou škrobu 2. Díky jejich fenotypovým vlastnostem by se obě daly zařadit do skupiny odrůd s nízkým obsahem škrobu (grinczech.vurv.cz). Obě odrůdy mají podobné potravinářské využití. Impala se využívá

jakožto varný typ B a Agáta jako varný typ AB (Čermák 2021). Po srovnání jejich rodokmenů v Evropské pěstitelské databázi Europotato bylo zjištěno, že odrůda Impala byla vyšlechtěna z genotypu BM5272 a odrůdy Bircana a odrůda Agáta vznikla z genotypu BM5272 a odrůdy Sirca (europotato.org). Tyto dvě odrůdy tedy spojuje společná matka, což vysvětluje podobné fenotypové vlastnosti a shodu alel.

Samostatnou větev s Agátou a Impalou, jež se odděluje od ostatních odrůd téměř na začátku, tvoří ještě s různou podobností Janet, Nancy, Inova a Colette. Všechny tyto odrůdy se využívají jako konzumní brambory, Janet jako varný typ A, Nancy jako varný typ AB, Inova jako varný typ B a Colette jako varný typ A (europlant.cz). I u nich byly srovnány rodokmeny v databázi Europotato. Bylo zjištěno, že některé z těchto odrůd mají společné předky. Odrůda Inova byla vyšlechtěna z odrůdy Nicola a Impala. Odrůdu Janet s odrůdou Agáta a tím pádem i s odrůdou Impala a Inova spojuje genotyp 52/72/2206. U odrůdy Colette nebyli v rodokmenu nalezeni společní předci s odrůdami tvořícími tuto větev. Rodokmen odrůdy Nancy nebyl v databázi Europotato nalezen (europotato.org).

Na druhou stranu nejodlišnější od všech ostatních odrůd byla odrůda Colomba. Tato odrůda má také jako jediná nejnižší hodnotu škrobu, což znamená hodnotu škrobu 1, která udává obsah škrobu v bramborové hlíze pod 10 % (grinczech.vurv.cz). V databázi Europotato byl zjištěn původ odrůdy Colomba, který udává, že vznikla z odrůd Carreara a Agáta (europotato.org). Odrůda Agáta, která má být otcem odrůdy Colomba, se s touto odrůdou v alelickém profilu vůbec neshoduje. Vysvětlením pro tuto skutečnost by mohlo být, že příbuzní této odrůdy nejsou ti, kteří se prezentují v rodokmenu a její původ je ve skutečnosti jiný. Nebo to mohlo vzniknout chybou v průběhu amplifikace či vyhodnocování vzorků. Colomba je velmi raná konzumní odrůda, varný typ AB (www.medipo-agras.cz).

Dendogram dále odhaluje podobnost alel u odrůdy Victoria s hodnotou škrobu 5 a odrůdy Agria s odlišnou hodnotou škrobu 2. Shoda alel v tomto případě může být vysvětlena blízkou příbuzností odrůd, neboť z databáze Europotato vyplývá, že Agria je matka Victorie (europotato.org). Victoria i Agria jsou polorané konzumní brambory, varný typ B (europlant.cz). Dle shody alel jsou si blízké i odrůdy Marabel s hodnotou škrobu 6 a Elfe s hodnotou škrobu 2. Přitom tyto dvě odrůdy mají zřetelně odlišný pozorovaný fenotyp a ani v databázi Europotato nebyla nalezena shoda v jejich rodokmenech (europotato.org). Odrůda Marabel je raná až velmi raná odrůda, která je určena pro přímý konzum, varný typ B (Čermák 2019). Odrůda Marabel má shodný varný typ jako raná odrůda Elfe (europlant.cz).

Významnou shodu alel má i odrůda Krumlov s hodnotou škrobu 6 a odrůda Žofie se stejnou hodnotou škrobu (grinczech.vurv.cz). Rodokmeny těchto odrůd nebyly v databázi Europotato nalezeny (europotato.org). Krumlov je pozdní odrůda určená pro zpracování na škrob (Čermák 2014). Další podobná mikrosatelitní jaderná DNA byla zaznamenána u odrůdy Esprit (3) a odrůdy Soraya (2), které taktéž nelze v databázi Europotato dohledat (europotato.org). Obě odrůdy se přitom dají zařadit do skupiny odrůd s nízkým obsahem škrobu v bramborové hlíze (grinczech.vurv.cz). Odlišný obsah škrobu, avšak podobný výskyt alel se vyskytnul u odrůd Bernadette (2) a Dali (5). Obě odrůdy se však využívají jako varný typ AB (medipo-agras.cz).

Po prozkoumání Obrázku 15 nelze jednoznačně tvrdit, že polymorfismus mikrosatelitní jaderné DNA je možné asociovat s obsahem škrobu v hlízách bramboru, tím pádem není ani možné potvrdit hypotézu. V některých případech je sice známá asociace mikrosatelitní jaderné

DNA s obsahem škrobu v bramborových hlízách, není to však pravidlem. Dendogram totiž odhalil i odrůdy se shodou alel, a přitom s neshodou obsahu škrobu v bramborových hlízách, ale také odrůdy se shodou obsahu škrobu v hlízách brambor, a přitom s neshodou alel.

6.2.1 Dendogram pro marker STG0001

Obrázek nacházející se v příloze č. 1 znázorňuje dendogram z programu DARwin6 pro marker STG0001. Nejvýznamnější shoda alel byla zaznamenána u odrůdy Rita s hodnotou škrobu 5 a u odrůdy Lori s hodnotou škrobu 4. Obě odrůdy je tedy možno zařadit do skupiny odrůd se středním obsahem škrobu v bramborové hlíze (grinczech.vurv.cz). U těchto dvou odrůd přitom nebyla nalezena žádná shoda v rodokmenech vyskytujících se v databázi Europotato (europotato.org). Další podobnost byla zjištěna u odrůdy Elfe (2), Esprit (3) a Marabel (6). Odrůda Marabel na rozdíl od odrůdy Esprit a Elfe spadá do skupiny odrůd se středním obsahem škrobu v hlíze (grinczech.vurv.cz). Značnou shodu v mikrosatelitní jaderné DNA mají i odrůdy Cascada (2), Gala (3) a Valetta (3), které náleží do skupiny odrůd s nízkým obsahem škrobu a jejichž rodokmen nebyl nalezen v databázi Europotato (europotato.org). Další podobnost alel byla zjištěna u odrůdy Petra (7) a Passat (3), jež mají výrazně odlišný obsah škrobu v hlízách (grinczech.vurv.cz). Přitom ani v rodokmenech těchto dvou odrůd nebyli nalezeni společní předci (europotato.org).

Mezi odrůdy, které se svou podobností v alelickém profilu značně odlišují od ostatních, patří hned několik odrůd. Mezi ně lze zařadit následující odrůdy: Colomba (1), Agáta (2), Lada (4), Monika (4), Catriona (3), Ostara (3), Franzi (3), Forelle (7), Ornella (5), Jelly (4), Asterix (5), Terka (2), Ramses (5), Nomade (5), Jolana (4), Innovator (5), Filea (4), Courage (4), Bella (4), Vendula (2), Sinora (4), Karin (3), Camilia (5), Barbora (3), Belana (3), Arabela (6), Annabelle (3), Radana (3) anebo Presto (4).

6.2.2 Dendogram pro marker STG0010

Na dendogramu v příloze č. 2 je možno spatřit, že u markeru STG0010 má podobný alelický profil hned několik odrůd. Mezi tyto odrůdy náleží kupříkladu Agria s hodnotou škrobu 2 a Heidi mající hodnotu škrobu 3. Obě tyto odrůdy tudíž spadají do skupiny odrůd s nízkým obsahem škrobu (grinczech.vurv.cz). Jejich rodokmeny v databázi Europotato nebyly nalezeny (europotato.org). Tyto dvě odrůdy se shodují i zemí původu, kterou je Německo (grinczech.vurv.cz). Podobnost v alelickém profilu byla zjištěna i o odrůdy Evita (4), Valy (4) a Arabela (6), přičemž všechny tyto odrůdy lze zařadit do skupiny odrůd s nízkým obsahem škrobu.

Jako další odrůdy s podobným alelickým uspořádáním je možno zmínit následující odrůdy: Ostara (4), Eba (5), Forelle (7), Cecile (4), Sprit (3), Ramses (5), Opal (5), Rebel (6) a Kiwi (5.) Mezi zmíněnými odrůdami nebyla nalezena žádná jiná spojitost. Naopak nejvzdálenější od ostatních jsou odrůdy Atlantic (5), Markies (5), Nomade (5) a Innovator (5).

6.2.3 Dendogram pro marker STI0012

Na obrázku v příloze č. 3 se nachází dendogram znázorňující alelický profil pro marker STI0012, kde je možno vidět podobný alelický profil hned u několika alel. Mezi ně patří například Tasso s hodnotou škrobu 7 náležící mezi odrůdy s vysokým obsahem škrobu v hlíze

a Nomade spadající s hodnotou škrobu 5 mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v bramborové hlíze (grinczech.vurv.cz). Po porovnání rodokmenů těchto dvou odrůd v databázi Europotato nebyla zjištěna jejich příbuznost (europotato.org). Shoda v alelickém profilu se vyskytuje též u odrůdy Soraya, která se svou hodnotou škrobu 2 patří do skupiny odrůd s nízkým obsahem škrobu v bramborové hlíze a u odrůdy Verdi, která s hodnotou škrobu 6 náleží mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v hlíze. Podobnost byla zjištěna také u odrůd Orlík (7), Passat (3), Pana (5) anebo u odrůd Rita (5), Karatop (6), Terka (2) a Goliath (6).

Svým alelickým profilem jsou značně odlišné od ostatních odrůd následující odrůdy: Dorret (6), Desire (3), Siby (7), Valfi (3), Jelly (4), Krumlov (6), Ramses (5), Andonte (4), Wega NEW (2), Vendula (2), Secura (2), Poutník (5), Mírage (4), Madeleine (2), Leoni (3) a Flavia (4).

6.2.4 Dendogram pro marker STM1052

Na obrázku v příloze č. 4 je možno spatřit dendogram pro marker STM1052. Na něm je vidět, že nejpodobnější jsou si v alelickém profilu u markeru STM1052 následující odrůdy: Hinderburg (5), Bintje (3), Atleet (6), Fanal (6) a Sylvana (3). Naopak nejmenší shodu v alelickém profilu u markeru STM1052 mají následující odrůdy: Catriona (3), Katnov (7), Apta (5), Marena (4), Cecilie (4), Cascada (2), Opal (5), Granola (3), Wega NEW (2), Secura (2), Orbit (5), Kiebitz (6), Gala (3), Magda (4), Karatop (6).

Střední podobnost v alelickém profilu byla zaznamenána u odrůd Hydra (3) a Eurostarch (8). Přitom Hydra spadá mezi odrůdy s nízkým obsahem škrobu v bramborové hlíze a Eurostarch lze zařadit mezi odrůdy s vysokým obsahem škrobu (grinczech.vurv.cz). Stejně značná podobnost v alelickém profilu byla zaznamenána i u odrůdy Victoria a Pirol, přičemž obě se vyznačují hodnotou škrobu 5. Stejně podobné jsou si i odrůdy Ostara (3) a Berber (2) anebo odrůdy Petra (7) a Goliath (6).

6.2.5 Dendogram pro marker STM1064

Na dendogramu pro marker STM1064 na v příloze č. 5 se vyskytují tři odrůdy odlišné alelickým profilem od ostatních, a to odrůda Saturna (6), Apta (5) a Satina (4). Všechny tyto zmíněné odrůdy patří mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v bramborové hlíze. Naopak podobnost v alelickém profilu byla zaznamenána u odrůdy Eba s hodnotou škrobu 5 a u odrůdy Vendula mající hodnotu škrobu 2. Odrůda Eba spadá mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v bramborové hlíze a odrůda Vendula mezi odrůdy s nízkým obsahem škrobu v bramborové hlíze (grinczech.vurv.cz). Další podobnost alelického profilu byla zjištěna u odrůd Szignal (4), Dominátor (4) a Radana (3), dále u odrůd Mozart (4), Asterix (5), Sinora (4) anebo u odrůd Rosara (7), Axa (3) a Andante (4).

6.2.6 Dendogram pro marker STM1104

Z dendogramu v příloze č. 6 je možno vyčíst, že nejodlišnější alelický profil u markeru STM1104 má hned několik odrůd, a to odrůda Ostara (3), Franzi (3), Forelle (7), Verdi (6), Krasa (3), Monika (4), Verona (3) a Bernard (4). Podobnost v alelickém profilu se vyskytuje u odrůdy Solara, patřící s hodnotou škrobu 4 mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v bramborové hlíze, s odrůdou Vinetou náležící s hodnotou škrobu 3 mezi odrůdy s nízkým

obsahem škrobu. Po porovnání rodokmenů těchto dvou odrůd v databázi Europotato nebyla nalezena jejich příbuznost. Další shoda v alelickém profilu byla nalezena u odrůd Sibů (7), Priamos (5), Pirol (5) a Karatop (6), u odrůd Valfi (3), Sirius (6) a Kiwi (5) anebo u odrůd Opal (5) a Velox (4).

6.2.7 Dendogram pro marker STM0031

Z dendogramu pro marker STM0031 v příloze č. 7 je patrné, že největší podobnost v alelickém profilu mají odrůda Mozart a Marena a odrůda Lydia a Elfe. Odrůda Mozart i Marena mají hodnotu škrobu 4, čili se řadí ke skupině odrůd se středním obsahem škrobu v hlíze (grinczech.vuurv.cz). Odrůda Marena je stejně jako odrůda Mozart vhodná pro přímý konzum, a to jako varný typ B (Čermák 2021). U těchto odrůd nebyly nalezeni společní předci v databázi Europotato (europotato.org). Odrůda Lydia s hodnotou škrobu 3 i Elfe s hodnotou škrobu 2 náleží mezi odrůdy s nízkým obsahem škrobu v hlíze.

Trochu menší podobnost v alelickém profilu byla zjištěna u odrůdy Ramses (5) a Verdi (6), kdy obě odrůdy spadají mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v hlíze. Stejná podobnost v alelickém profilu byla zaznamenána i u odrůdy Baccara (3) a Arnova (2), u odrůdy Saturna (6), Petra (7), Ornella (5), Ditta (3), Sinora (4) a Magda (4) anebo u odrůdy Franzi (3), Wega NEW (2) a Marabel (6). Svým alelickým profilem jsou značně odlišné od ostatních odrůd následující odrůdy: Desiree (3), Binte (3), Kuras (7), Dominátor (4), Golf (6), Filea (4), Esprit (3) a Bellarosa (3).

6.2.8 Dendogram pro marker STM5114

Z dendogramu v příloze č. 8 vyplývá, že mezi odrůdy, které se u markeru STM5114 v alelickém profilu značně odlišují od ostatních, patří hned několik odrůd. Mezi ně náleží následující odrůdy: Pana (5), Sibů (7), Verne (5), Esprit (3), Rebel (6), Mariska (3), Monika (4), Lada (4) a Berber (2). Všechny ostatní odrůdy jsou mírou podobnosti v alelickém profilu stejné. Lze mezi ně zařadit odrůdu Victorii (5) se středním obsahem škrobu v hlíze a odrůdu Orlik (7) mající vysoký obsah škrobu v bramborové hlíze. U těchto dvou odrůd nebyla nalezena žádná shoda v rodokmenech vyskytujících se v databázi Europotato (Europotato.org). Dále jsou si podobné odrůdy Dorett (6) a Velox (4), také Saturna (6) a Velox (4) anebo Roberta (6), Ditta (3) a Annabelle (3).

6.2.9 Dendogram pro marker STM0019

Dle dendogramu pro marker STM0019 v příloze č. 9 jsou v alelickém profilu nejodlišnější od ostatních následující odrůdy: Courage (4), Lada (4), Petra (7), Samantana (4), Marcela (3), Vendula (2), Sprint (4), Impala (3), Heidi (3), Courage (4) a Lada (4). Ostatní odrůdy jsou si v alelickém profilu podobné, patří mezi ně například Ostara (3) s nízkým obsahem škrobu v hlíze a Eurostarch (8) s vysokým obsahem škrobu v hlíze, jehož rodokmen nebyl nalezen v databázi Europotato (europotato.org). Další podobnost v alelickém profilu byla zjištěna u odrůdy Fanal (6), odrůdy Franzi (3) a odrůdy Granola (3). Podobný alelický profil u markeru STM0019 má také odrůda Westamyl (7) s odrůdou David (6). Odrůda David i odrůda Westamyl slouží pro výrobu škrobu (Čermák 2017).

6.2.10 Dendogram pro marker STI0033

Z dendogramu pro marker STI0033 v příloze č. 10 je patrné, že mezi odrůdy s odlišným alelickým profilem od ostatních, patří několik odrůd. Mezi ně náleží následující odrůdy: Bintje (3), Catriona (3), Atlantic (5), Passat (3), Lori (4), Fanal (6), Apta (5), Valfi (3), Lydia (3), Kuras (7), Dominátor (4), Wega NEW (2), Sirius (6). Ostatní odrůdy mají stejnou podobnost v alelickém profilu. Mezi ně patří kupříkladu Dorret (6), Eurostarch (8) či Fontane (4), anebo odrůda Samanta a Saline, které s hodnotou škrobu 4 spadají mezi odrůdy se střední hodnotou škrobu v bramborové hlíze (grinczech.vurv.cz). Další podobnost v alelickém profilu jeví odrůda Mozart (4) s odrůdou Marena (4), obě odrůdy mají střední obsah škrobu v hlíze, avšak v databázi Europotato nebyla nalezena shoda v jejich rodokmenech (europotato.org). Podobnost v alelickém profilu byla zjištěna také u odrůdy Franzi (3), Marabel (6) a Elfe (2) anebo u odrůdy Valetta (3), Franceline (4), Žofie (6) a Rita (5).

6.2.11 Dendogram pro marker STI0003

Dendogram pro marker STI0003 v příloze č. 11 udává, že mezi odrůdy s odlišným alelickým profilem od ostatních hodnocených odrůd lze zařadit odrůdu Gelbling (4), Franzi (3), Kuras (7), Verne (5), Orbit (5) a odrůdu Komtesu (4). Ostatní odrůdy jsou si v alelickém profilu podobné. Mezi ně patří kupříkladu odrůda Desiree (3) s odrůdou Susan (3), které mají nízký obsah škrobu v hlíze, ale jejich rodokmeny nalezené v databázi Europotato nevykazují žádnou spojitost (europotato.org). Shoda odrůd Desiree a Susan se nachází i ve varném typu, který je B (Čermák 2017). Dále jsou si v alelickém profilu podobné odrůdy Forelle (7), Eurostarch (8), Innovator (5) a Sinora (4) anebo odrůdy Dorret (6), Satina (4), Rosara (7) a Axa (3).

6.2.12 Dendogram pro marker STI0014

Z dendogramu pro marker STI0014 v příloze č. 12 vyplývá, že se v něm vyskytuje několik odrůd, které jsou v alelickém profilu odlišné od ostatních. Jsou mezi nimi tyto odrůdy: Goliath (6), Satina (4), Bernard (4), Andante (4), Granada (4), Valetta (3) a Sprint (4). Ostatní odrůdy mají podobný alelický profil. Patří mezi ně kupříkladu Dorret (6) a Velox (4), které mají střední obsah škrobu v bramborové hlíze. Obsah škrobu odrůdy Dorret se pohybuje mezi 18,1-20 % a obsah škrobu u odrůdy Velox je 14,6-16 % (grinczech.vurv.cz). Další podobnost v alelickém profilu je patrná u odrůdy Forelle (7) s vysokým obsahem škrobu a odrůdy Barbora (3) s nízkým obsahem škrobu. Odrůda Forelle je vhodná jako salátová odrůda (europotato.org). Barbora je raná konzumní odrůda, pro kterou je typická dobrá skladovatelnost a varný typ B (Domkářová et al. 2017). Další podobnost v alelickém profilu vykazují odrůdy Rebel (6), Jolana (4), Roberta (6), Eurostarch (8), Samantana (4) a Franzi (3).

6.2.13 Dendogram pro marker STI0032

Dle dendogramu pro marker STI0032 v příloze č. 13 mají největší odlišnost v alelickém profilu následující odrůdy: Bintje (3), Hydra (3), Szignal (4), Realta (5), Eba (5), Franzi (3), Valfi (3), Kuras (7), Dominátor (4), Vlasta (3), Spirit (3), Ramses (5), Nomade (5) Innovator (5), Granola (3), Ditta (3), Sirius (5), Campina (3), Valetta (3) a Riviera (3). U ostatních odrůd byla zaznamenána podobnost v alelickém profilu, patří mezi ně například odrůda Passat (3)

s nízkým obsahem škrobu v bramborové hlíze s odrůdou Eurostarch (8) s vysokým obsahem škrobu v hlíze, dále také odrůda Ostara (3) a Kotnov (7) nebo odrůda Goliath (6) a Sibů (2). Další podobnost v alelickém profilu byla zaznamenána u odrůdy Apta (5) a Lada (4) se středním obsahem škrobu v hlíze. Po srovnání rodokmenů těchto dvou odrůd v databázi Europotato byla zjištěna jako jejich společný předek odrůda Hinderburg (europotato.org).

6.2.14 Dendogram pro marker STI0004

Z dendogramu pro marker STI0004 v příloze č. 14 je patrné, že mezi odrůdy s odlišným alelickým profilem od ostatních náleží hned několik odrůd. Mezi ně je možno zařadit následující odrůdy: Ostara (3), Ballydoon (3), Forelle (7), Valfi (3), Samanta (4), Ornella (5), Dominátor (4), Cascada (2), Solara (4), Roberta (6), Innovator (5), Fabia (6), Barbora (3), Arabela (6), Sprint (4), Everest (2). Ostatní odrůdy jsou si v alelickém profilu podobné. Mezi ně náleží odrůdy Tasso (7), Bintje (3), Fanal (6), Verne (5) a Karatop (6). Podobnost v alelickém profilu je zřejmá i u odrůdy Priamos (5) se středním obsahem škrobu v hlíze s odrůdou Krasa (3) s nízkým obsahem škrobu v hlíze (grinczech.vurv.cz). Shoda v alelickém profilu byla zjištěna také u odrůdy Mozart (4) a Earline (3) anebo u odrůdy Heidrun (5) a Realta (5).

6.2.15 Dendogram pro marker STM1053

Z dendogramu pro marker STM1053 v příloze č. 15 vyplývá, že se v něm vyskytuje několik odrůd, které se v alelickém profilu shodují s ostatními. Mezi ně patří následující odrůdy: Bintje (3), Rita (5), Catriona (3), Atlantic (5), Realta (5), Petra (7), Passat (3), Earline (3), Ballydoon (3), Franzi (3), Apta (5), Westamyl (7), Valfi (3), Samantana (4), Mozart (4), Markies (5), Lydia (3), Krumlov (6), Dominátor (4), Žofie (6), Vlasta (3), Victoria (5), Solara (4), Pirol (5), Granola (3), David (6), Bernadette (2), Bella (4), Agria (2), Rebel (6), Natasha (2), Nancy (3), Mariska (3), Karin (3), Fabia (6), Agáta (2), Everest (2), Riviera (3), Adéla (3), Barbora (3), Belana (3) a Dali (5). Menší podobnost v alelickém profilu byla zjištěna u těchto odrůd: Fontane (4), Vendula (2), Markéta (2), Desiree (3), Hinderburg (5), Tasso (7), Orlík (7), Hydra (3), Dorett (6), Szignal (4) a u dalších...

6.2.16 Dendogram pro marker STM5127

Dle dendogramu pro marker STM5127 v příloze č. 16 mezi odrůdy, které se v alelickém profilu odlišují od ostatních náleží tyto odrůdy: Eba (5), Krumlov (6), Cecile (4), Verdi (6), Satina (4), Roberta (6), Opal (5), Valy (4), Orbit (5), Natasha (2), Valetta (3), Sprint (4), Lada (4), Inova (3). Ostatní odrůdy si jsou v alelickém profilu podobné. Podobnost v alelickém profilu se vyskytuje například u odrůd Kotnov (7), Kuras (7), Cascada (2), Solaria (4), mezi těmito odrůdami není jiná zpozorovaná spojitost (europotato.org). Dále jsou si v alelickém profilu podobné odrůdy Pana (5), Pirol (5) a Krasa (3) anebo odrůdy Komtesa (4), Soraya (2) a Forelle (7). Podobnost v alelickém profilu byla zjištěna i u odrůdy Bernard (4) s odrůdou Sirius (6), které patří mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v hlízách anebo u odrůdy Dorret (6) s odrůdou Velox (4), které taktéž náleží mezi odrůdy se středním obsahem škrobu v hlízách bramboru (grinczech.vurv.cz).

6.2.17 Dendogram pro marker STG0016

Na dendogramu v příloze č. 17 je možno spatřit, že se u markeru STG0016 vyskytuje několik odrůd s odlišným alelickým profilem. Mezi ně lze zařadit následující odrůdy: Ostara (3), Saphir (4), Franzi (3), Forelle (7), Marcela (3), Janet (3), Cascada (2), Žofie (6), Spirit (3), Solara (4), Roberta (6), Rebel (6), Volumia (3), Saline (4) a Radana (3). Ostatní odrůdy jsou si podobné. Mezi ně patří například Realta (5) a Leoni (3), které mají střední obsah škrobu v bramborové hlíze, obsah škrobu v bramborové hlízy se u odrůdy Realta pohybuje mezi 16,1-18 % a u odrůdy Leoni mezi 12,1-14 % (grinczech.vurv.cz). Další podobnost v alelickém profilu byla zaznamenána u odrůdy Kontov (7), Goliath (6), Valfi (3), Marena (4), Eurostarch (8), Pirol a Berber. Podobný alelický profil mají i odrůdy Filea (4) a Ditta (3) anebo odrůdy Kuras (7) a Priamos (5).

6.3 Celkové vyhodnocení

Výsledky ze studie Niu et al. (2019) naznačují, že se poměr mitochondriální a jaderné DNA podílí na tvorbě škrobu a sušiny. Khlestkin et al. (2020) zase uvádějí, že výtěžek škrobu z hlíz je spojen s řadou SNP z různých chromozomů v genomu bramboru. SNP je pak možné převést na PCR-markery, které jsou vhodné pro screeningové šlechtění odrůd brambor s požadovanými vlastnostmi škrobu. Díky statistikám asociačních testů včetně příbuznosti a populaci struktury brambor bylo reprodukováno pět známých asociací mezi znaky a markery a byly objeveny nové asociace, a to zejména pro výnos hlíz a výnos škrobu (Schönhals et al. 2016).

Závěry vyplývající z těchto studií je liší se závěry této práce. Tyto studie však byly vyhodnoceny jinými metodami. Na rozdíl od výše zmíněných studií v této práci byla usuzována asociace mikrosatelitních polymorfismů na základě porovnávání dendogramů, kdy byla srovnána shoda alelického profilu odrůd bramboru spolu s posuzovaným fenotypem, kterým v tomto případě byl obsah škrobu v bramborové hlíze. Dendogramy však asociaci mezi alelickým profilem a fenotypovými vlastnostmi nevyjadřovaly. Pro objektivnější posouzení asociace mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách by bylo třeba provést více analýz.

Hypotéza této diplomové práce byla, že polymorfismus mikrosatelitní jaderné DNA je možné asociovat s obsahem škrobu v hlízách bramboru. Tuto hypotézu není možné potvrdit. Asociace bramborového škrobu s mikrosatelitními polymorfismy však byla provedena jen pomocí srovnání dendogramů. Aby byla hypotéza jednoznačně potvrzena nebo vyvrácena jednostranně, bylo by třeba provést další statistické analýzy.

7 Závěr

- Tato diplomová práce se zabývala genetickou analýzou jaderné DNA u 153 vybraných odrůd bramboru (*Solanum tuberosum* L.) s různým potravinářským využitím, přičemž bylo využito mikrosatelitních SSR markerů. Dílčím cílem této práce bylo zanalyzovat získaná molekulární data a provést asociační studii mikrosatelitních polymorfismů s obsahem škrobu v hlízách bramboru.
- Byla optimalizována PCR reakce 17 jaderných mikrosatelitních SSR markerů v podobě tří multiplexů. Všechny vzorky byly posléze připraveny pro kapilární elektroforézu, na které byly vyhodnoceny.
- Data z kapilární elektroforézy byla zpracována a z těchto dat byl pro každý marker zvlášť vytvořen dendogram v programu DARwin. Po prozkoumání těchto dendogramů nelze jednoznačně tvrdit, že spolu souvisí přítomnost alel a fenotyp brambor. V některých případech je sice známá asociace mikrosatelitní jaderné DNA s obsahem škrobu v bramborových hlízách, není to však pravidlem. Dendogram totiž odhalil i odrůdy se shodou alel, a přitom s neshodou obsahu škrobu v bramborových hlízách, ale také odrůdy se shodou obsahu škrobu v hlízách brambor, a přitom s neshodou alel. Z tohoto důvodu nelze potvrdit hypotézu tvrdící, že polymorfismus mikrosatelitní jaderné DNA je možné asociovat s obsahem škrobu v hlízách bramboru.

8 Literatura

- Adriano DC. 1992. Biochemistry of trace metals. Lewis Publishers, USA.
- Ashley CT, Warren ST. 1995. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annual Reviews Genetic* **29**:703-728.
- Bach S, Yada RY, Bizimungu B, Fan M, Sullivan JA. 2013. Genotype by environment interaction effect on starch content and digestibility in potato (*Solanum tuberosum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:3941-3948.
- Bansal A, Kumari V, Taneja D, Sayal R, Das N. 2012. Molecular cloning and characterization of granule-bound starch synthase I (GBSSI) alleles from potato and sequence analysis for detection of cis-regulatory motifs. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **109**:247-261.
- Barnes WM. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of USA* **91**: 2216-2220.
- Bradshaw JE, Mackay BR. 1994. Potato genetics. Oxon: CAB International, Cambridge.
- Beals KA. Potatoes, nutrition and health. *American Journal of potato research* **96**:102-110.
- Berdan R. 2021. The microscopic structure of starch grains food microscopy part I. Available from [Food Microscopy- The Microscopic Structure of Starch Grains | Motic Microscopes](#). (accessed May 2021).
- Berry CS. 1986. Resistant starch: Formation and Measurement of starch that Survives Exhaustive Digestion with Amylolytic Enzymes during the Determination of dietary fibre. *Journal of Cereal Science* **4**:301-314.
- Bhargava A, Fuentes FF. 2010. Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology* **44**:250-266.
- Britannica, The Editors of Encyclopædia. 2021. Polymerase chain reaction. *Encyclopedia Britannica*. Available from <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction> (accessed March 2022).
- Brown CR. 2005. Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research* **82**:163-172.
- Burbank L. 1914. The potato itself – Who will improve it further? Luther Burbank Press, New York **7**:267–302.
- Burton WG. 1989. The Potato. *Journal of Potato Research* **32**:483–484.
- Camire ME, Kubov S, Donnelly DJ. 2009. Potatoes and Human Health. *Food science and nutrition* **49**:823-840.
- Carputo D, Frusciante L. 2011. Genetics, Genomics and Breeding of Potato. CRC Press, Portici.
- Casanas R, Gonzales M, Rodrigues E, Marrero A, Diaz C. 2002. Chemometric studies of chemical compounds in five cultivars of potatoes from Tenerife. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:2076-2082.
- CIP. Available from <https://cipotato.org/potato/how-potato-grows/> (accessed April 2022).
- Clark DP, Pazdernik NJ. 2013. Polymerase chain reaction. *Molecular biology*. Academic press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. 1996. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic acids research* **24**:3546-3551.
- Cutter EG. 1978. Structure and development of the potato plant. *The Potato Crop*, 70–152.

- Čermák V. 2014. Seznam doporučených odrůd brambor 2014. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
- Čermák V. 2017. Seznam doporučených odrůd brambor 2017. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
- Čermák V. 2019. Seznam doporučených odrůd brambor 2019. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
- Čermák V. 2021. Seznam doporučených odrůd brambor 2021. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
- Dean BB. 1994. *Managing the Potato Production System*. CRC Press, Boca Raton.
- Dimante I, Serafinovica S, Skrabule I, Tsahkna A, Hansons A. 2013. Baltic organic potato for the World markets (baltorgpotato) – increasing of economic competitiveness of stakeholders involved in organic potato food production chain. Page 240 in Součková H, editor. *Potato Agrophysiology 2013: Proceeding 2nd international symposium on agronomy and physiology of potato*, Havlíčkův Brod.
- Domkářová J, Krejča V, Kopačka V, Štefánek F, Vokál B. 2017. České odrůdy konzumních brambor 2017. ČMŠSA, Praha.
- Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C, Jiang J. 2000. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics* **101**:1001-1007.
- Dudáš F. *Skladování a zpracování rostlinných výrobků*. 1981. SZN, Praha.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Genetics* **5**:435-445.
- Europlant šlechtitelská společnost s.r.o. Available from europlant.cz (accessed April 2022).
- Evropská pěstitelská databáze Europotato. Available from www.europotato.org (accessed April 2022).
- Fajardo D, Haynes KG, Jansky S. 2013. Starch characteristic of modern and heirloom potato cultivars. *American Journal of Potato Research* **90**:460-469.
- Feingold, S., Lloyd, J., Norero, N., Bonierbale, M., Lorenzen, J. 2005. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* **111**:456–466.
- Field D, Wills C. 1996. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proc. Biol. Sci.* **263**:209-215.
- Ghislain M, Núñez J, Herrera MR, Pignataro J, Guzman F, Bonierbale M, Spooner DM. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol Breeding* **23**:377-388.
- Gopalan C, Ramashashtri BV, Balsubramanias SC. 1972. *Nutritive value of Indian food*. National Institute of Nutrition, Hyderabad.
- Hawkes JG. 1990 *The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press, London.
- Hawkes JG, Francisco-Ortega, J. 1992. The potato in Spain during the late 16th century. *Economic Botany* **46**:86–97.
- Heisler EG, Siciliano J, Krulick S, Porter WL, White JW. 1973. Nitrate and nitrite content of market potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **21**:970-973.
- Heldt HW, Piechulla B, Heldt F. 2011. *Plant Biochemistry*. Academic Press, USA.

- Hopkins J. 1995. The glycoalkaloids: naturally of interest (but a hot potato?). *Food and Chemical Toxicology* **33**:323-328.
- Horáková J, Mayer V, Ševčík J. 2006. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chemické listy* **100**:163-168.
- Horowitz JL. 2005. Department of Economics, Northwestern University, Evanston, USA.
- Hoshino AA, Bravo JP, Nobile PM, Morelli KA. 2012. Microsatellites as tools for genetics diversity analysis. *Genetic Diversity in Microorganism*, InTech. Available from <http://www.intechopen.com/books/geneticdiversity-in-microorganismus/microsatellites-as-tools-for-genetic-diversity-analysis>.
- Ismail S, Essawi M. 2012. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics* **1**:57-63.
- Jun J. 1983. Skladování brambor. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Jun J, Novotnáková D. 1982. Skladování brambor podle užitkových směrů a odrůd. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposonbased DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* **98**:704-711.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**:309-334.
- Kingman SM, Englyst HN. 1994. The influence of food preparation methods on the in-vitro digestibility of starch in potatoes. *Food chemistry* **49**:181-186.
- Khlestkin VK, Erst TV, V. Rozanova IV, Efimov VM, Khlestkina EK. 2020. Genetic loci determining potato starch yield and granule morphology revealed by genome-wide association study (GWAS).
- Knight TA. 1807. On raising of new and early varieties of the potato (*Solanum tuberosum*). *Transactions of the Horticultural Society of London* **1**:57-59.
- Külen O, Stushnoff C, Holm DG. 2013. Effect of cold storage on total phenolics content, antioxidant activity and vitamin C level of selected potato clones, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**:2437-2444.
- Lauro M, Forssell PM, Sourtti MT, Hulleman SHD, Poutanen KS. 1997. α -amylolysis of large barley starch granules. *Cereal Chemistry* **79**:925-930.
- Lee KR, Kozukue N, Han JS, Park JH, Chang EY, Baek EJ. 2004. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:2832-2839.
- Li YCh, Korol AB, Fahima T, Nevo E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**:203-221.
- Lisinska G, Leszczynski W. 1989. *Potato Science and Technology*. Springer, New York.
- Liu ZJ Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**:1-37.
- Love SL, Pavek JJ. 2008. Positioning the Potato as a Primary Food Source of Vitamin C. *American Journal of Potato Research* **85**:277-285.
- Mäder J, Rawel H, Kroh LW. 2009. Composition of Phenolic Compounds and Glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine during Commercial Potato Processing. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**:6292-6297.

- Martins-Farias R. 1976. New archaeological techniques for the study of ancient root crops in Peru. Unpublished PhD. Thesis, University of Birmingham, UK.
- Medipo agras H.B. spol. s.r.o. Available from www.medipo-agras.cz (accessed April 2022).
- Milbourne, D., Meyer, R.C., Collins, A.J., Ramsay, L.D., Gebhardt, C., Waugh, R. 1998. Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet.* **259**: 233±245.
- Ministerstvo zemědělství. 2012. Vyhláška č. 129 ze dne 18. dubna 2012, kterou se stanoví podrobnosti uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu. Sbírka zákonů České republiky, částka 48. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství. 2021. Vyhláška č. 397 ze dne 29. října 2021, kterou se stanoví požadavky na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány. Sbírka zákonů České republiky, 2021, částka 178. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství. 2003. Zákon číslo 219 ze dne 31. července 2003 o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby). Sbírka zákonů České republiky 2003, částka 79. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství. 2020. Zákon číslo 334 ze dne 6. srpna 2020, kterým se mění zákon č. 2019/2009 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby), ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Sbírka zákonů České republiky 2020, částka 134. Česká republika.
- Mohanty IC, Mahapatra D, Mohanty S, Das AB. 2004. Karyotype analyses and studies on the nuclear DNA content in 30 genotypes of potato (*Solanum tuberosum*) L. *Cell Biology International.* **28**:625-633.
- Niu S, Zhang G, Li X, Haroon M, Si H, Fan G, Li XQ. 2019. Organelle DNA contents and starch accumulation in potato tubers. *Theoretical and Applied Genetics* **132**:205-216.
- Niwattanakul S, Singthongchai J, Naenudorn E, Wanapu S. 2013. Using of Jaccard Coefficient for Keywords Similarity. *Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists 2013 Vol I, IMECS 2013, March 13 - 15, 2013, Hong Kong.*
- Nordahl O, Koch-Schmidt P, Sunde J, Yildirim Y, Tibblin P, Forsman A. 2019. Genetic differentiation between and within ecotypes of pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst* **29**:1923–1935.
- Oliemans HO. 1988. Het brood van de armen (The bread of the poor). SDU uitgeverij, s'Gravenhage, the Netherlands.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira LC. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**:294-307.
- Pouvreau L, Gruppen H, Piersma SR, Broek LAM, Koningsveld GA, Votagen AGJ. 2001. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of agricultural and food chemistry* **49**:2864-2874.
- Raigond P, Singh B, Dutt S, Chakrabarti SK. 2020. *Potato: Nutrition and Food Security.* Springer nature, Singapore.
- Ravishankar KV, Bommisetty P. 2013. Simple sequence repeats amplification. *Microsatellites. Methods and Protocols.* Human Press, New York.
- Reader J. 2008. *Potato: A history of the Propitious Esculent.* Yale University press, New Haven, Connecticut.

- Sanches-Castillo CP, Dewey PJS, Aguirre A, Lara JJ, Vaca R, Barra PL. 1998. The mineral content of Mexican fruits and vegetables. *Journal of food composition and analysis* **11**:340-356.
- Sedlák, P., Sedláková, V., Vašek, J., Zeka, D., Čílová, D., Melounová, M., Orsák, M., Domkářová, J., Doležal, P., Vejl, P. 2022. Phenotypic, molecular and biochemical evaluation of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. bulbocastanum*. *Scientific Reports*, v tisku.
- Schönhals EM, Ortega F, Baranadalla L, Aragonés A, Galarreta JI, Liao JC, Sanetomo R, Walkemeier B, Tacke E, Ritter E, Gebhardt C. 2016. Identification and reproducibility of diagnostic DNA markers for tuber starch and yield optimization in a novel association mapping population of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet* **129**:767-785.
- Singh J, Kaur L. 2016. *Advances in potato chemistry and technology*. Academic press, Amsterdam.
- Singh J, Kaur L. 2009. *Advances in potato chemistry and technology*. Academic Press, Amsterdam.
- Slavík B. 2000. *Květena České republiky 6*. Academia, Praha.
- Sokal R, Mechener ChD. 1958. *A statistical method for evaluating systematic relationships*. University of Kansas Science Bulletin.
- Spooner DM, McLean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:14694-14699.
- Stasiak M, Rusinek R, Molenda M, Fornal J, Blaszczyk W. 2011. Effect of potato starch modification on mechanical parameters and granules morphology. *Journal of Food Engineering* **102**:154-162.
- Stawski D. 2008. New determination method of amylose content in potato chemistry. *Food Chemistry* **110**:777-781.
- Stephen AM, Champ MMJ, Cloran SJ, Fleith M, Van Lieshout L, Mejbörn H, Burley VJ. 2017. Dietary fibre in Europe: current state of knowledge of definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutrition Research Reviews* **30**:149-190.
- Sung JH, Park DP, Park BJ, Choi HJ, Jhon MS. 2005. Phosphorylation of Potato Starch and Its Electrorheological Suspension. *Biomacromolecules* **6**:2182-2188.
- Svegmark K, Helmersson K, Nilsson PO, Andersson R, Svensson E. 2002. Comparison of potato amylopectin branches and potato branches – influence of year and variety. *Carbohydrate Polymers* **47**:331-340.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. 2002. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal Agricultural Food Chemistry* **50**:4998-5006.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acid res* **17**:6463-6471.
- Tellier R, Bukh J, Emerson SU. 2003. Long PCR amplification of large fragments of viral genomes: a technical overview. *Methods Mol Biol*. **226**:167-172.

- Tester RF, Karkalas J, Qi X. 2004. Starch-Composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal Science* **39**:151-165.
- Tóth G, Gáspari Z, Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* **10**:967-981.
- Valkonen JPT, Keskilato M, Vasara T, Pietila L. 1996. Potato glycoalkaloids: a burden or a blessing? *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**:1-20.
- Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin I*. OSSIS, Tábor.
- Výzkumný ústav rostlinné výroby. Databáze Grinczech výzkumného ústavu rostlinné výroby. Available from www.grinczech.vurv.cz (accessed from April 2022).
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W. 1995. *DNA fingerprinting in plant and fungi*. CRC press, Boca Raton.
- Werij JS, Furrer H, Eck H, Visser RGF, Bachem ChWB. 2012. A limited set of starch related genes explain several interrelated traits in potato. *Euphytica* **186**: 501-516.
- White J, Cooke RJ. 1992. A standard classification system for the identification of barely varieties by electrophoresis. *Seed Sci. Technol* **20**:663-676.
- Wijesinha-Bettoni R, Moouillé B. 2019. The Contribution of Potatoes to Global Food Security, Nutrition and Healthy Diets. *Amerivan Journal of Potato Research* **96**:139-149.
- Wilkinson MJ. 1994. *Genome evolution in potatoes. Potato genetics*. University press, UK.
- Woolfe J. 1987. *The potato in the human diet*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Žižka J. 2020. *Situační a výhledová zpráva brambory*. Ministerstvo zemědělství, Praha.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

DNA – deoxyribonukleová kyselina

CE – kapilární elektroforéza

RS-resistentní škrob

BAC – bakteriální umělý chromozom

FISH – fluorescenční in situ hybridizační

Bp – pár báze

PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězcová reakce

PIC - obsah polymorfní informace

SGA - steroidní glykoalkaloidy

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

SSR - simple sequence repeats

STR - short tandem repeats

UPGMA-metoda neváženého párování s aritmetickým průměrem

10 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Rostlina bramboru obecného (*Solanum tuberosum* L.).

Obrázek 2: Struktura α -chaconinu.

Obrázek 3: Standardní typy chromozomů (A-D) \times chromozomy v somatické buňce tetraploidního bramboru.

Obrázek 4: Mikrosatelity – shrnutí vývoje, funkce, distribuce a aplikace.

Obrázek 5: Polymerázová řetězová reakce.

Obrázek 6: Schematické znázornění amylopektinu.

Obrázek 7: Schematické znázornění amylosy.

Obrázek 8: Bramborový škrob.

Obrázek 9: Biosyntéza škrobu.

Obrázek 10: Genetická SSR mapa brambor zahrnující 17 v této práci analyzovaných SSR markerů.

Obrázek 11: Rovnice vyjadřující Jaccardův koeficient.

Obrázek 12: Výsečový graf - zastoupení odrůd dle místa původu.

Obrázek 13: Výsečový graf udávající zastoupení odrůd v hodnoceném souboru dle obsahu škrobu v bramborové hlíze.

Obrázek 14: Výsečový graf udávající zastoupení hodnocených odrůd podle toho, zda se jedná o brambory s nízkým, středním či vysokým obsahem škrobu.

Obrázek 15: Souhrnný dendrogram z DARwin.

Tabulka 1: Výživová tvrzení pro brambory vařené se slupkou a beze slupky.

Tabulka 2: Rozsah ztrát vitamínu C v bramborových hlízách, které byly vystaveny různým způsobům přípravy.

Tabulka 3: Členění výrobků z brambor na skupiny.

Tabulka 4: Charakteristika markerů – multiplex 1.

Tabulka 5: Charakteristika markerů – multiplex 2.

Tabulka 6: Charakteristika markerů – multiplex 3.

Tabulka 7: Souhrn časů a teplot během PCR.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro multiplex 1 o cellkovém objemu 10 μ l, zásobní roztoky jednotlivých primerů měly koncentraci 4 μ M.

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro multiplex 2 o cellkovém objemu 10 μ l, zásobní roztoky jednotlivých primerů měly koncentraci 4 μ M.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro multiplex 3 o cellkovém objemu 10 μ l, zásobní roztoky jednotlivých primerů měly koncentraci 4 μ M.

Tabulka 11: Porovnání země původu odrůd s průměrným obsahem škrobu.

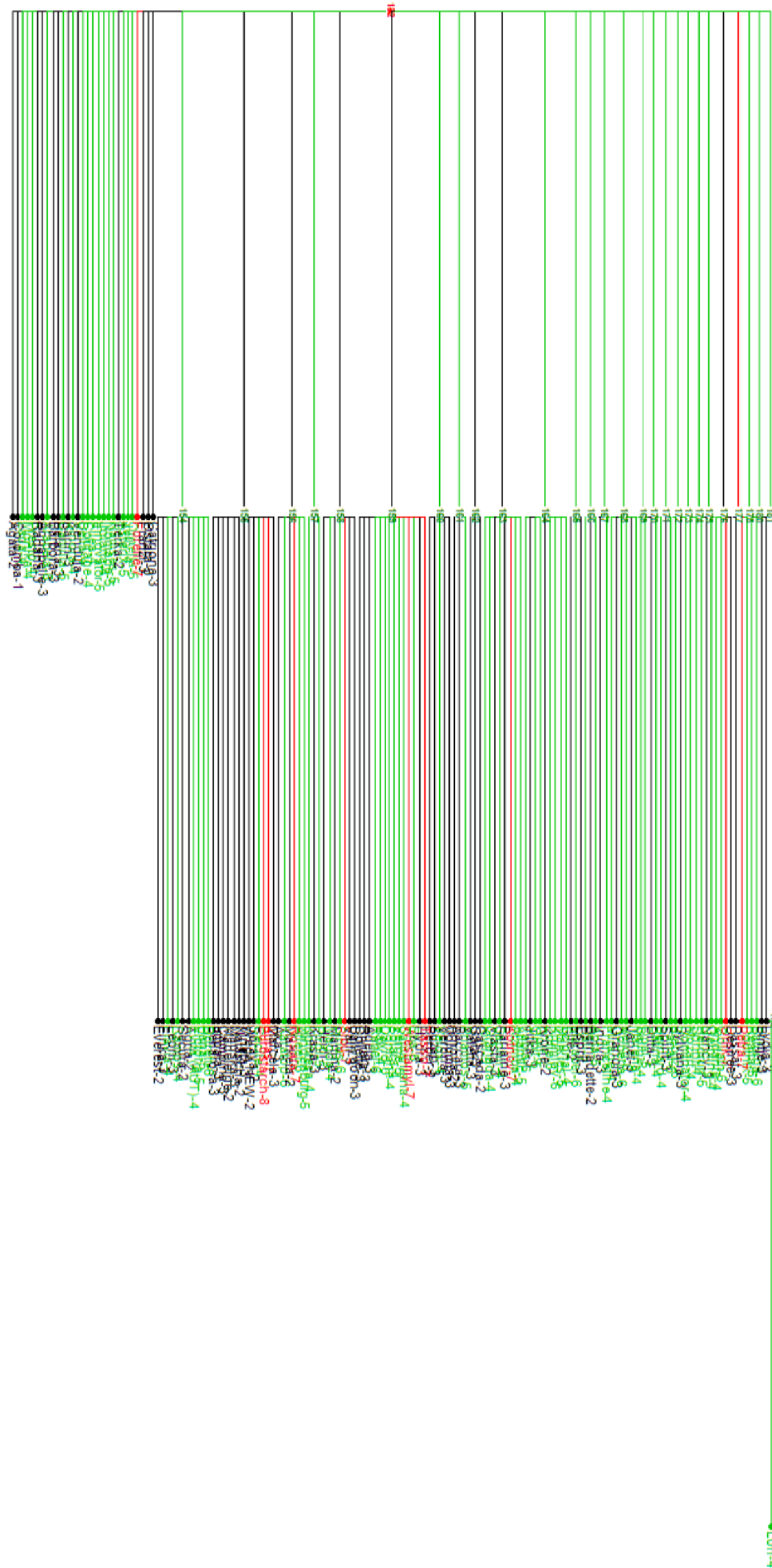
Tabulka 12: Četnost jednotlivých alel.

Tabulka 13: Četnost výskytu odrůd v hodnoceném souboru dle obsahu škrobu v bramborové hlíze.

Tabulka 14: Zastoupení odrůd v této práci podle toho, zda se jedná o brambory s nízkým, středním či vysokým obsahem škrobu.

11 Samostatné přílohy

Příloha č. 1 Dendrogram z DARwin - marker STG0001.



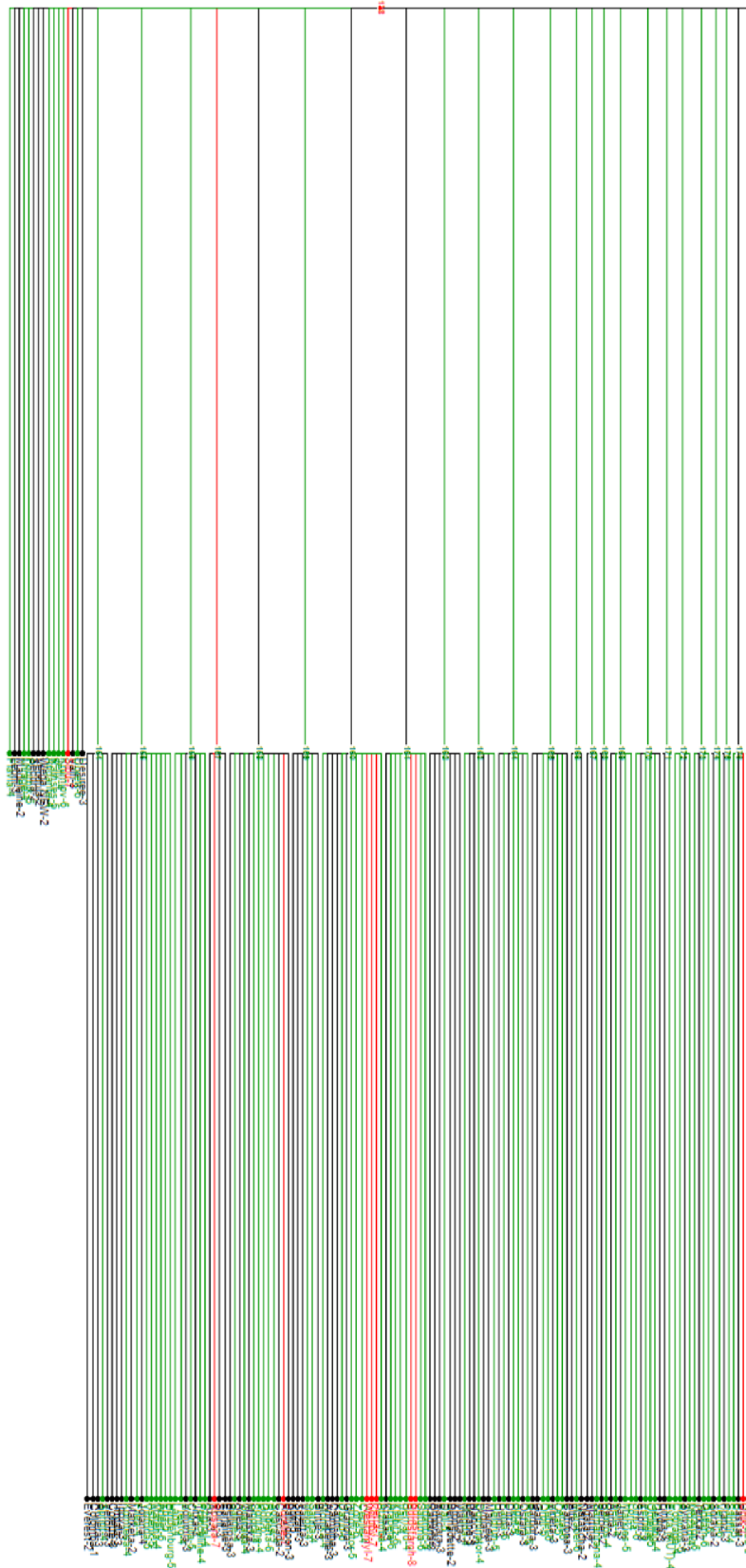
Na obrázku v příloze č. 1 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 2 Dendogram z DARwin - marker STG0010.



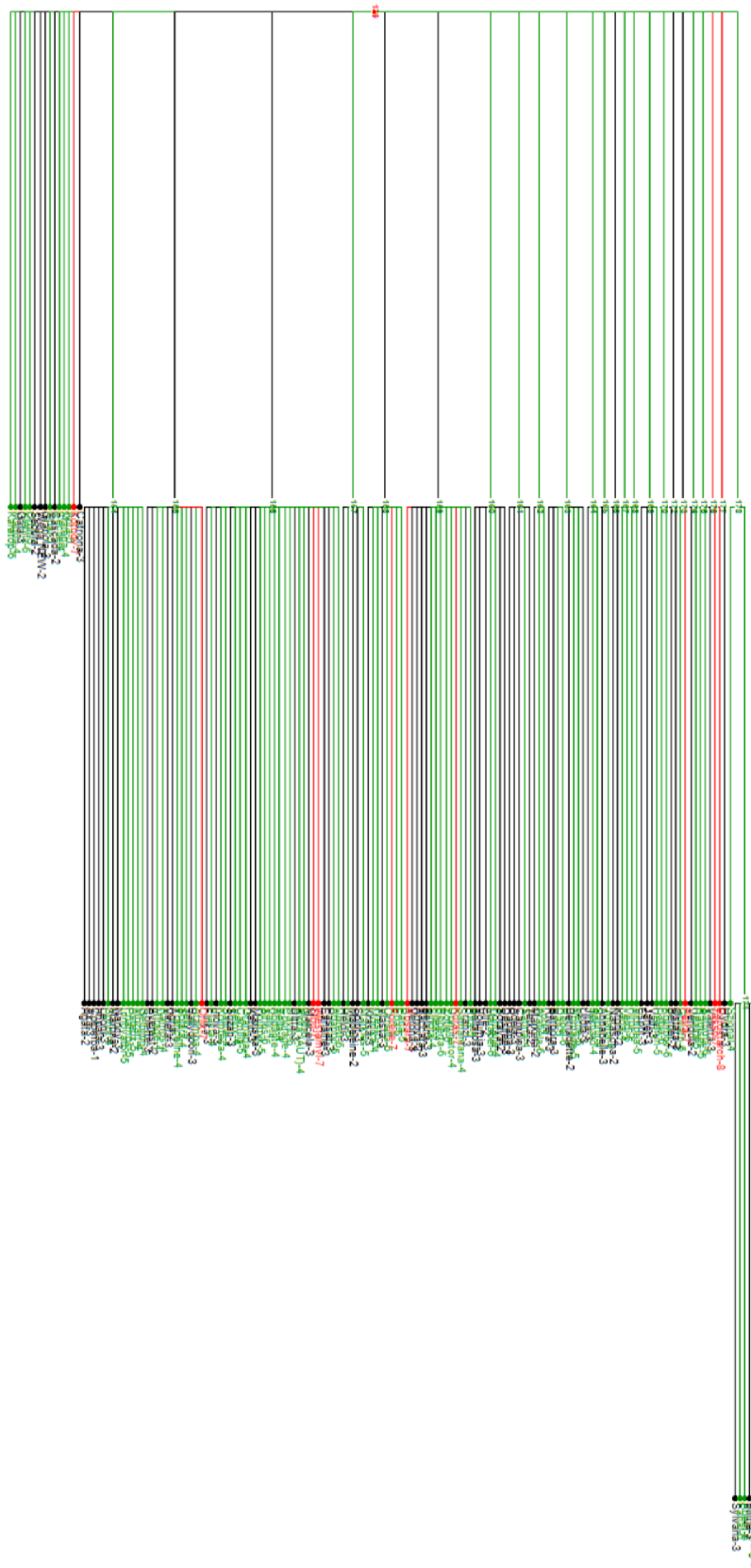
Na obrázku v příloze č. 2 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 3 Dendogram z DARwin - marker STI0012.



Na obrázku v příloze č. 3 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č 4 Dendogram z DARwin - marker STM1052.



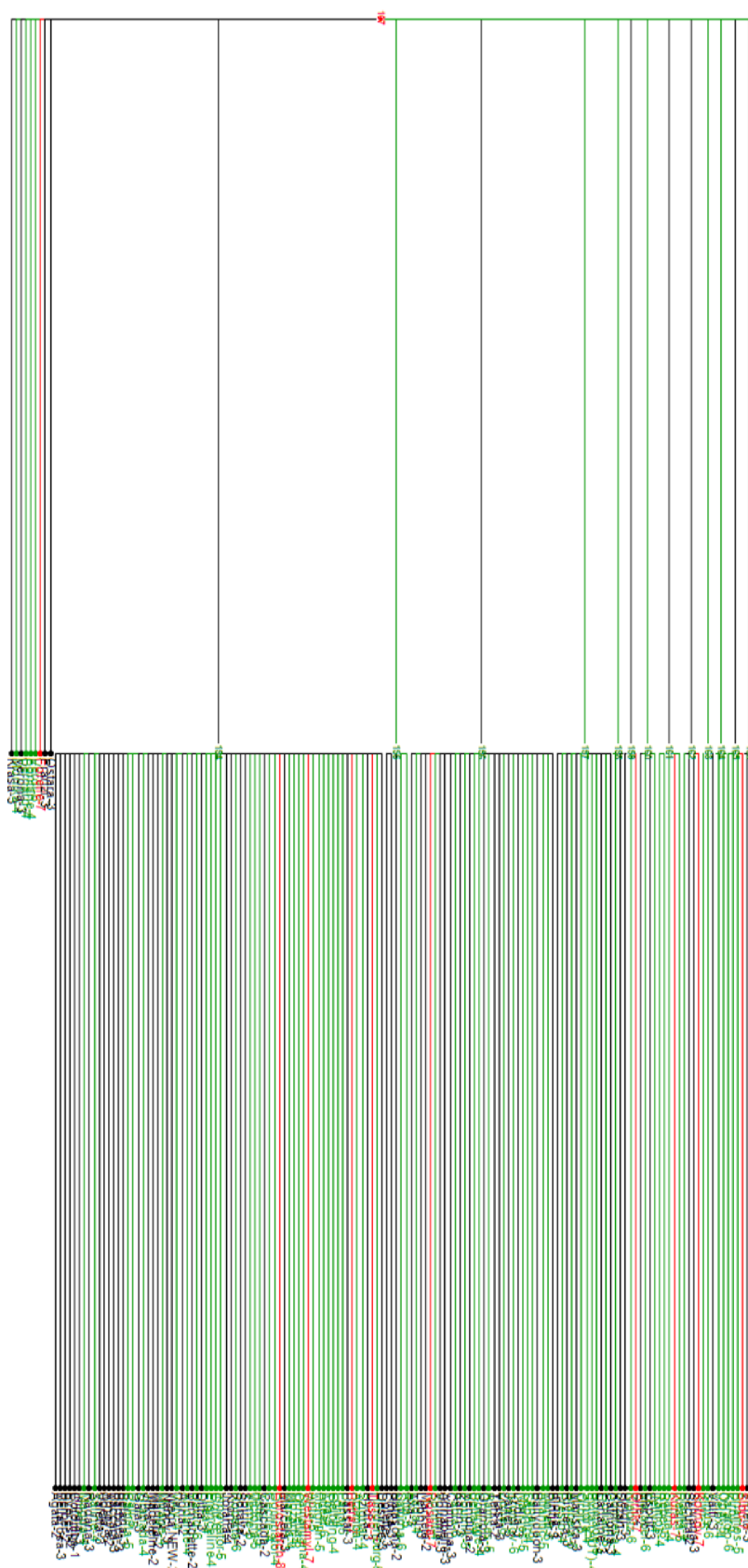
Na obrázku v příloze č. 4 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 5 Dendrogram z DARwin - marker STM1064.



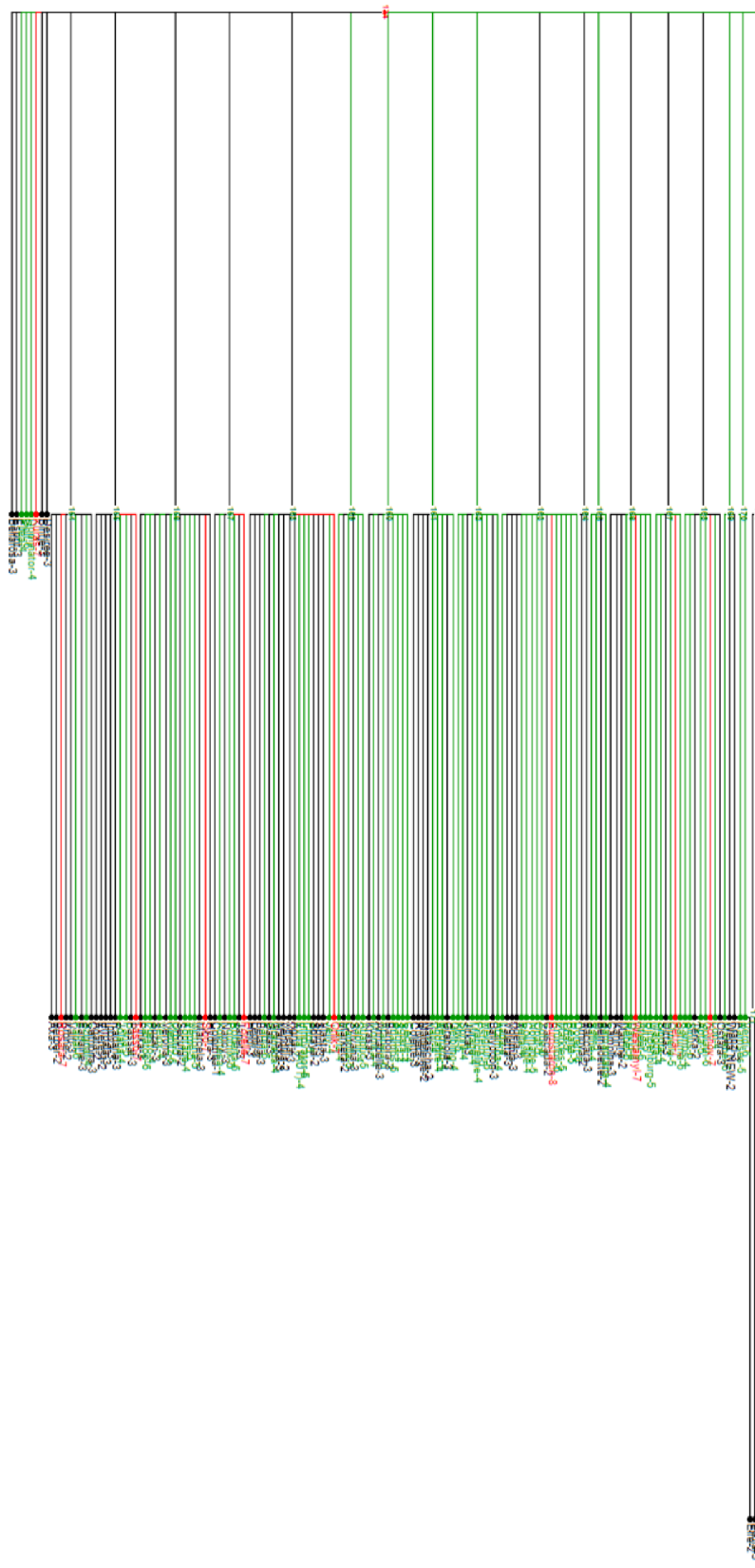
Na obrázku v příloze č. 5 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 6 Dendrogram z DARwin - marker STM1104.



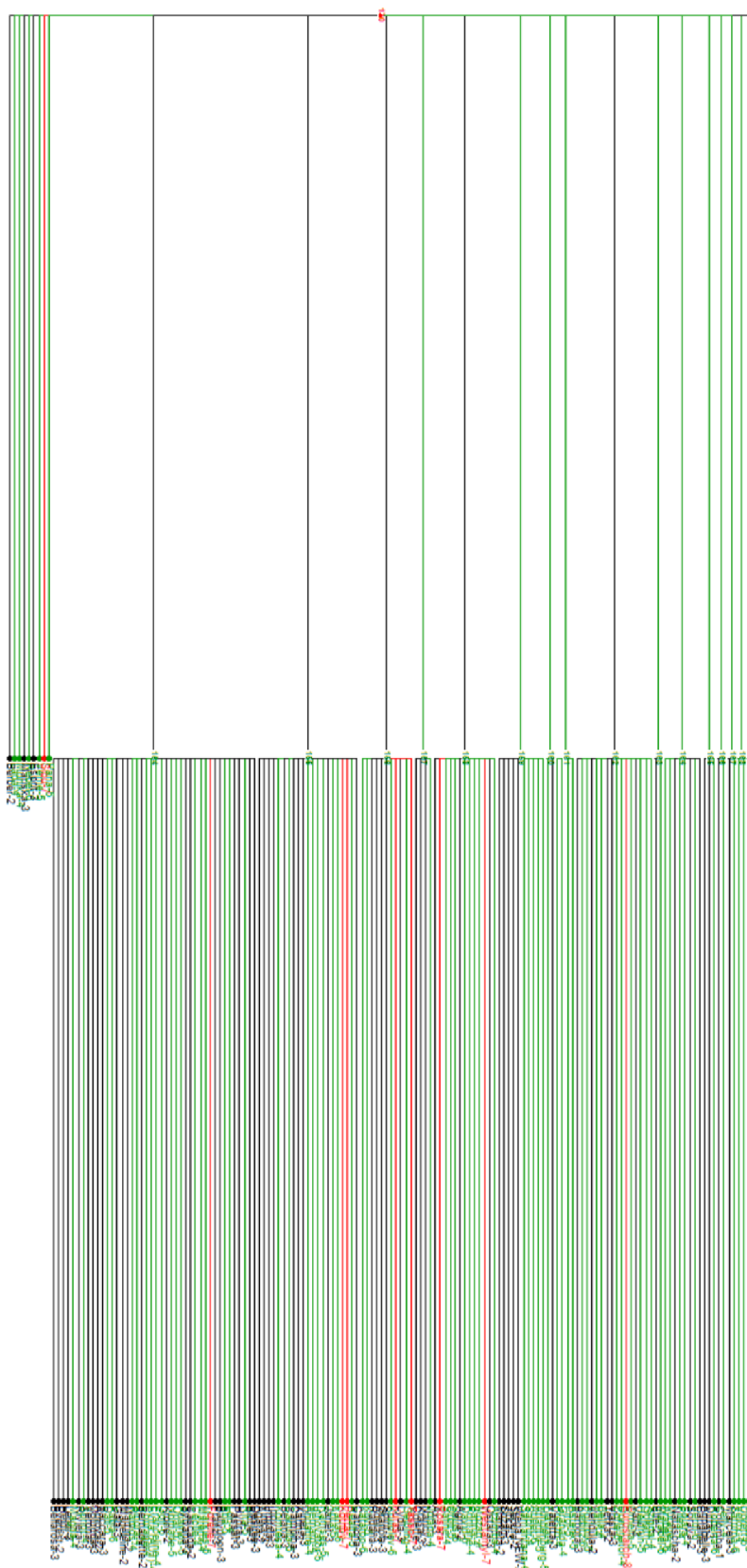
Na obrázku v příloze č. 6 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 7 Dendogram z DARwin - marker STM0031.



Na obrázku v příloze č. 7 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 8 Dendogram z DARwin - marker STM5114.



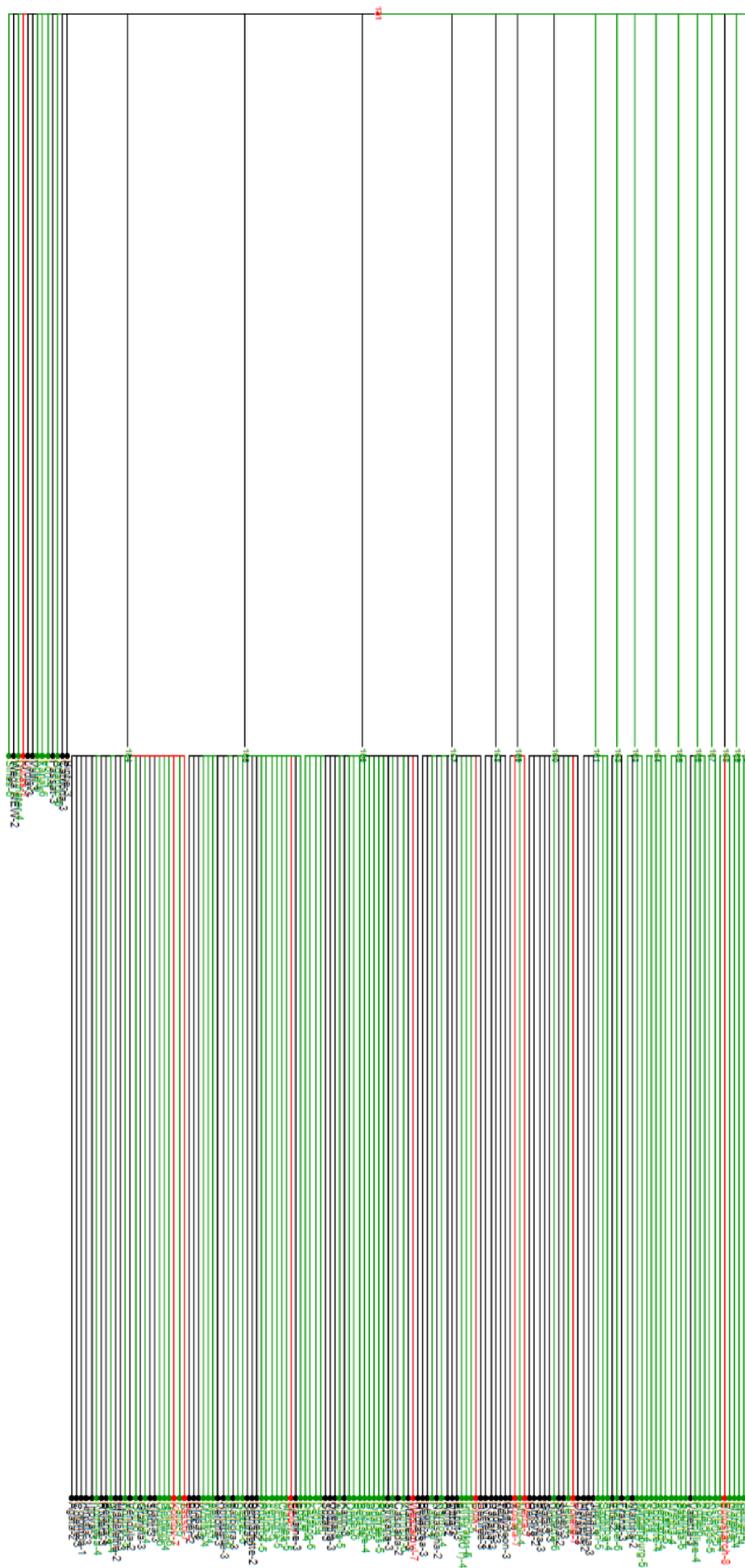
Na obrázku v příloze č. 8 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 9 Dendrogram z DARwin - marker STM0019.



Na obrázku v příloze č. 9 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 10 Dendrogram z DARwin - marker STI0033.



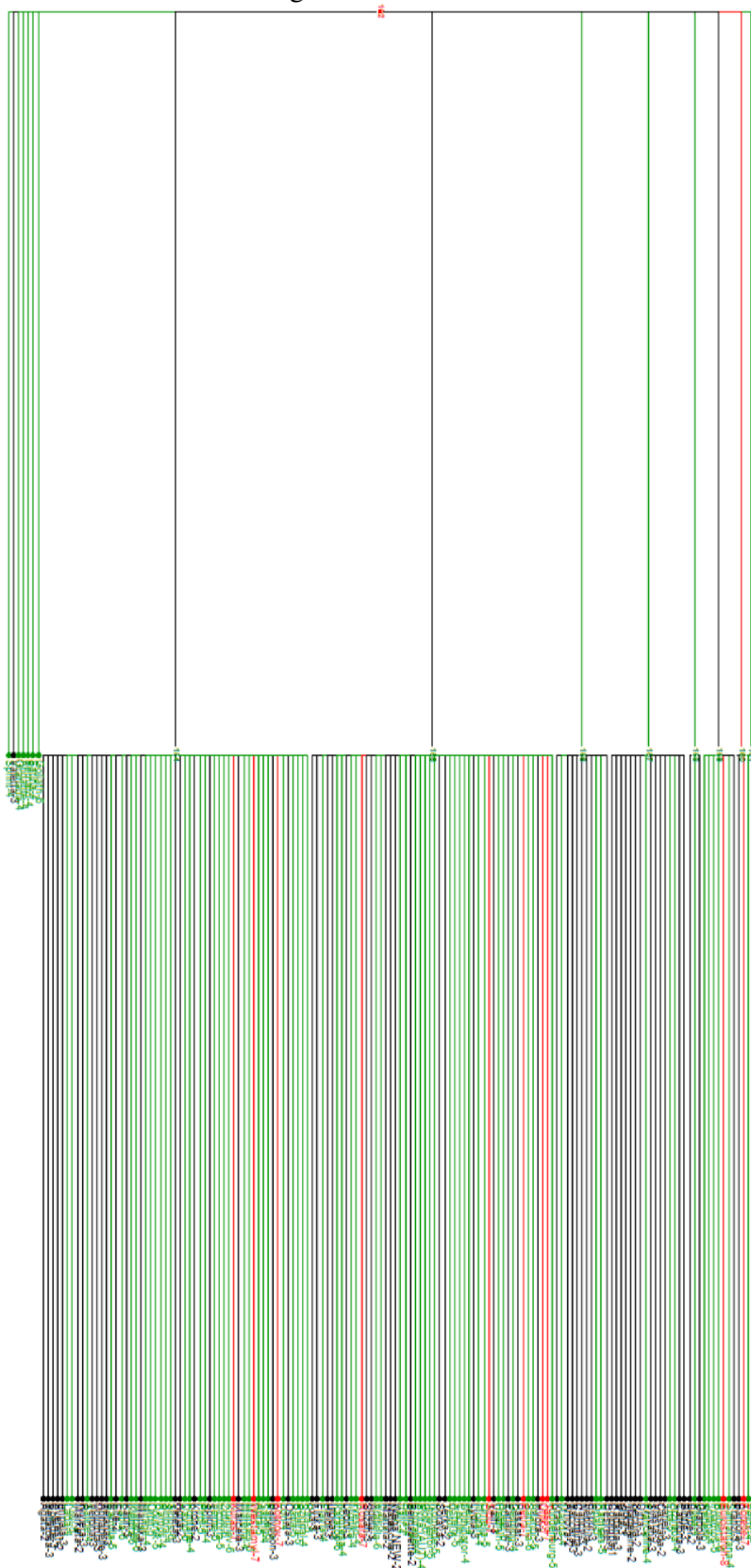
Na obrázku v příloze č. 10 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 11 Dendrogram z DARwin - marker STI0003.



Na obrázku v příloze č. 11 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 12 Dendrogram z DARwin - marker STI0014.



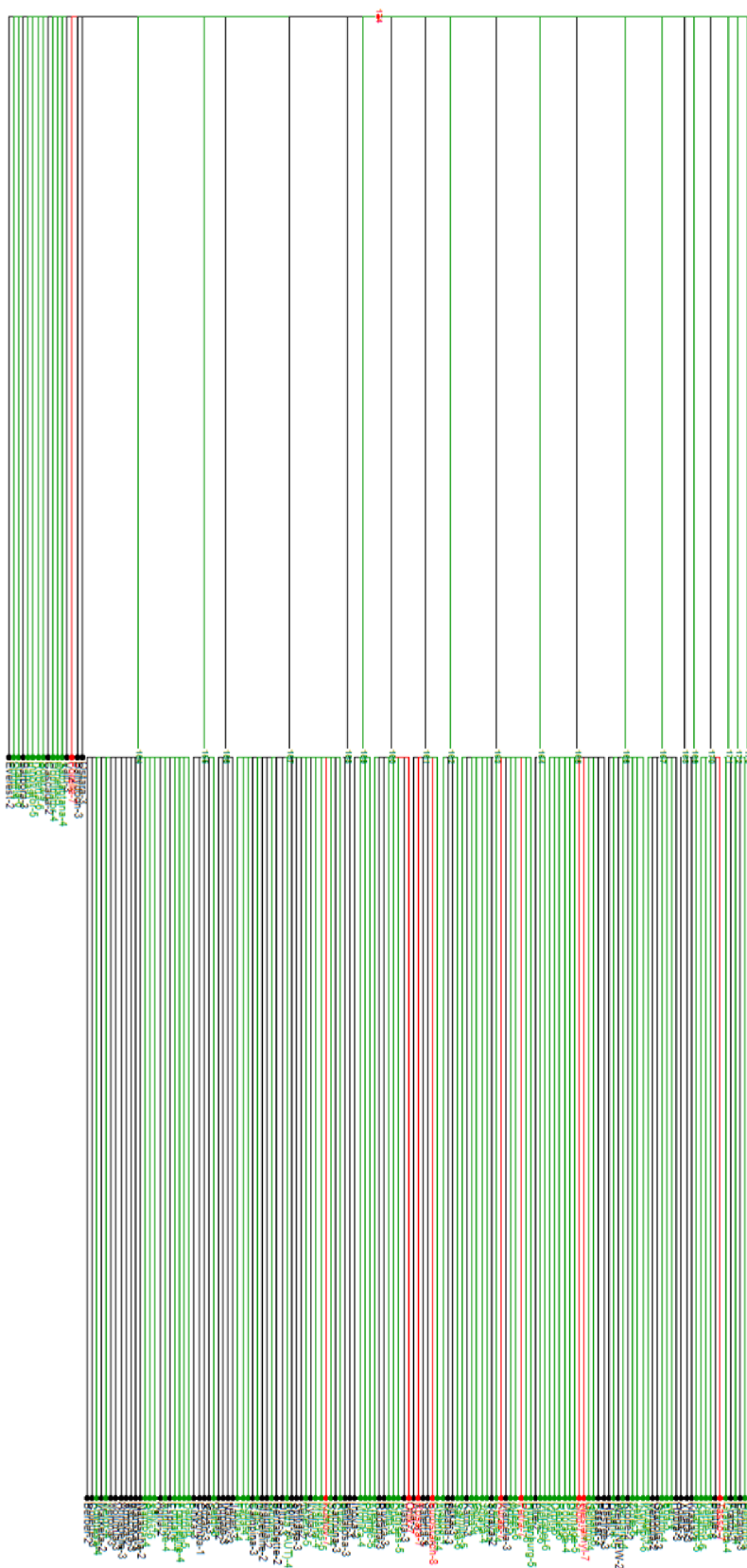
Na obrázku v příloze č. 12 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 13 Dendrogram z DARwin - marker STI0032.



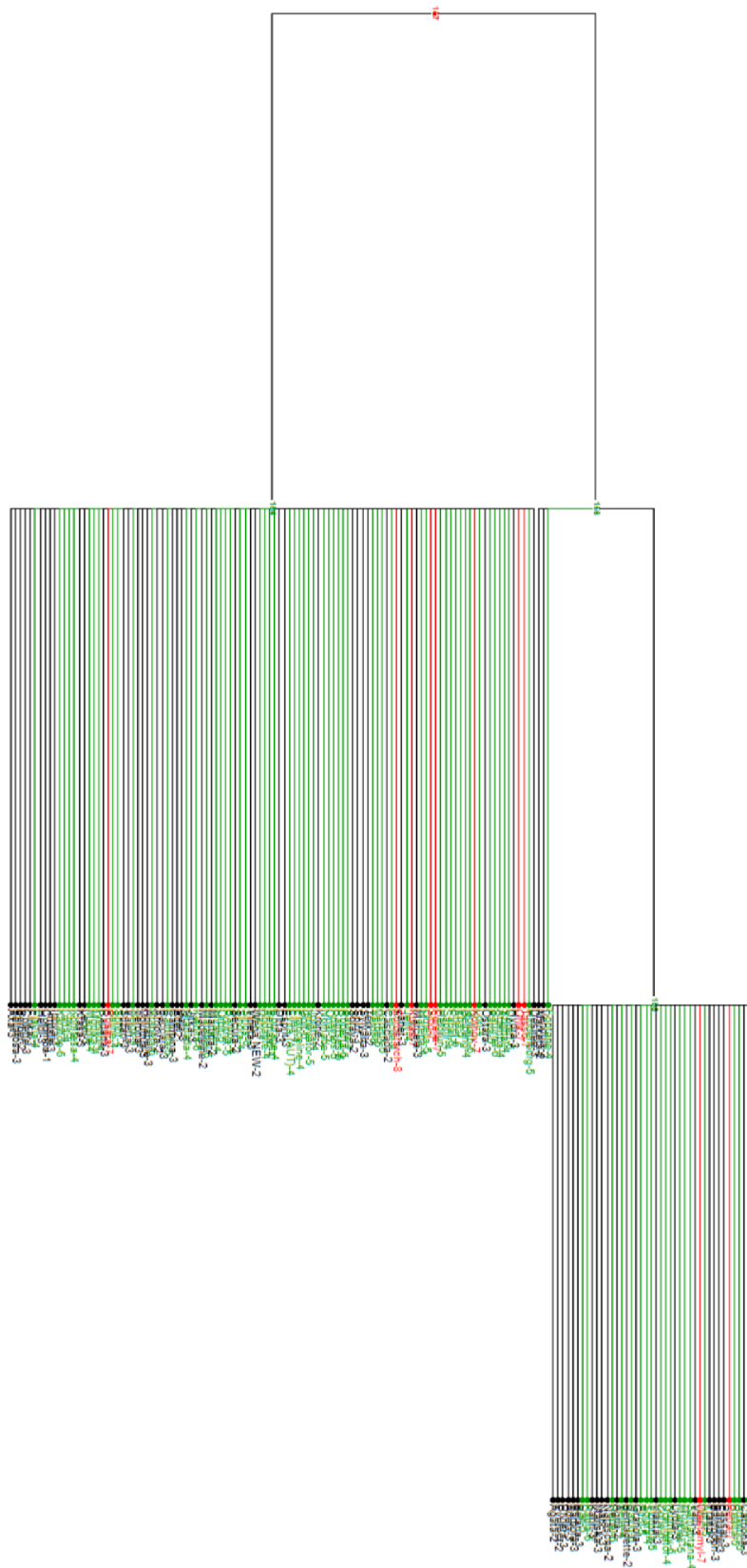
Na obrázku v příloze č. 13 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 14 Dendrogram z DARwin - marker STI0004.



Na obrázku v příloze č. 14 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 15 Dendogram z DARwin - marker STM1053.



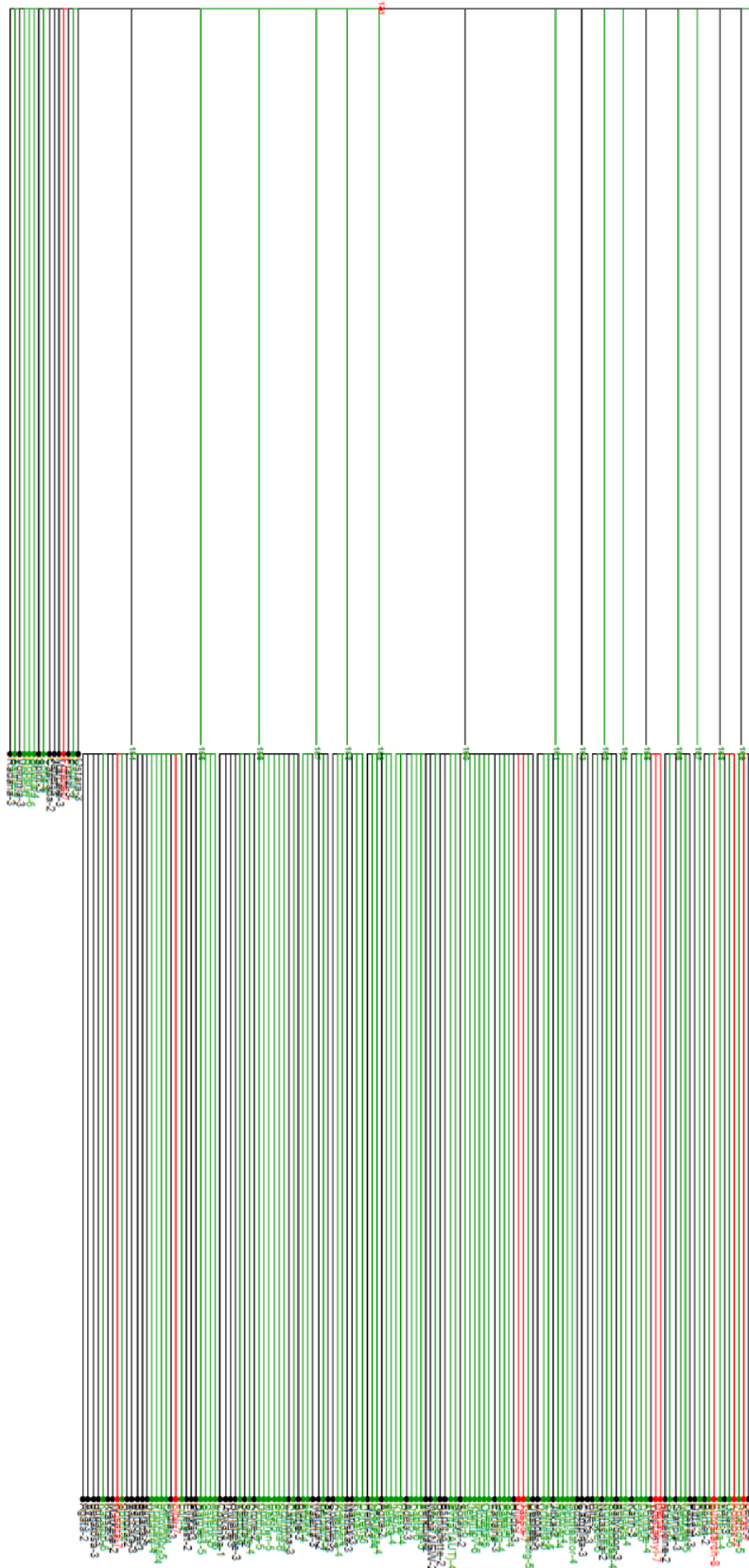
Na obrázku v příloze č. 15 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 16 Dendogram z DARwin - marker STM5127.



Na obrázku v příloze č. 16 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.

Příloha č. 17 Dendogram z DARwin - marker STG0016.



Na obrázku v příloze č. 17 jsou vyznačeny černou barvou odrůdy s obsahem škrobu 1-3, zelenou barvou odrůdy s obsahem škrobu 4-6 a červenou barvou odrůdy s hodnotou škrobu 7-8.