

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Studium diversity chmele pomocí molekulárních markerů**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jana Nekolná**

**Vedoucí práce: Ing. Jakub Vašek, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium diversity chmele pomocí molekulárních markerů" 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 10. 4. 2015

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Jakobovi Vaškovi, Ph.D., za odborné rady, konzultace a vedení během celé diplomové práce. Mé velké díky patří také dalším pracovníkům Katedry genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze, zejména paní Ing. Daniele Čílové za nezanedbatelnou pomoc a oporu při práci v laboratoři a dále paní Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D., za podnětné rady ohledně chloroplastových mikrosatelitů.

Na závěr bych ráda poděkovala zaměstnancům Chmelařského institutu s. r. o., v Žatci za poskytnutí a odběr vzorků, a to jmenovitě panu Ing. Vladimíru Nesvadbovi, Ph.D., paní Bc. Aleně Henychové a paní Ing. Zdeňce Polončíkové.

# Studium diversity chmele pomocí molekulárních markerů

## Souhrn

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) je dvoudomá vytrvalá rostlina, využívaná především v pivovarnictví. Český chmel má dlouholetou tradici a je celosvětově známý díky své kvalitě. Tato diplomová práce se věnuje zkoumání diversity u chmele, jelikož genetická diverzita má velký význam nejen globálně, ale i v rámci druhu. Ke studiu diversity lze použít různé druhy markerů. Tato práce se zabývá chloroplastovými mikrosatelitními markery (cpSSR), které mohou být důležitým zdrojem informací k hodnocení diversity a dle dostupných údajů u chmele zatím příliš využívány nebyly. Experimentální část této práce vychází z předpokladu, že chloroplastová DNA je konzervativní a z toho důvodu bude možné použít ke zkoumání genetické diversity chmele chloroplastové mikrosatelity navržené původně pro jiný druh. Tento předpoklad byl v experimentální části práce ověřen a 23 cpSSR navržených původně pro tabák (*Nicotiana tabacum* L.) se podařilo u chmele aplikovat celkem 10 markerů v podobě dvou multiplexů – M1 a M2. Ze získaných 10 markerů bylo 6 polymorfních, přičemž v každém z těchto polymorfních lokusů byly nalezeny dvě, popř. tři alely. Multiplexy M1 a M2 byly otestovány na 225 genotypech jak kulturního, tak planého chmele různého geografického původu a následně byla provedena statistická analýza. Celkem bylo pomocí těchto cpSSR markerů nalezeno 5 haplotypů (a–e), přičemž haplotypy b a e byly u testovaných chmelů zastoupeny nejvíce (> 95 %). Na základě této analýzy byly chmely z hlediska geografického původu rozděleny do dvou odlišných skupin. První skupinu tvořily chmely původem z Evropy a Kavkazu, zatímco do druhé skupiny byly zařazeny chmely původem z Ameriky. Toto rozdělení je v souladu s výsledky dříve provedených studií.

**Klíčová slova:** *Humulus lupulus* L.; chmel; SSR markery; DNA profiling; genové zdroje

# Analysis of hop diversity by molecular markers

## Summary

Hop (*Humulus lupulus* L.) is a dioecious perennial plant, largely used in brewing. Czech hop has a long tradition and is known for its quality worldwide. This thesis analyses the diversity of the hop, because genetic diversity is not only of great importance globally, but also within species. Various kinds of genetic markers can be used to study diversity. This thesis deals with the chloroplast microsatellite markers (cpSSR), which can be an important source of information to evaluate the diversity and according to available data, they were not yet very used at hops. The experimental part of this thesis is based on the assumption that chloroplast DNA is conservative and therefore chloroplast microsatellites originally designed for other species can be used to study genetic diversity of hop. His assumption was verified by experimental part, and out of 23 cpSSR originally designed for tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) a total of 10 markers succeeded in hop in the form of two multiplexes - M1 and M2. From the 10 markers obtained were 6 polymorphic, and in each of these polymorphic loci were found two or three alleles. Multiplexes M1 and M2 were tested on 225 genotypes, both cultural and wild hops of different geographical origin, and subsequently the statistical analysis was performed. There were 5 haplotypes (a–e) found by using these cpSSR markers, where haplotypes b a e were most frequently found among tested hops (> 95 %). Based on this analysis, the hops in terms of geographical origin are divided into two distinct groups. The first group consisted of hops originating from Europe and the Caucasus, while the second group includes hops originating from America. This division is consistent with the results of earlier studies.

**Keywords:** *Humulus lupulus* L.; hop; SSR markers; DNA profiling; genetic resources

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Vědecké hypotézy .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Přehled literárních poznatků .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Chmel (<i>Humulus lupulus</i> L.).....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Systematika chmele .....	10
3.1.2 Historie pěstování chmele.....	12
3.1.3 Biologie chmele .....	13
3.1.4 Genetika chmele .....	17
3.1.4.1 Velikost genomu .....	17
3.1.4.2 Chromozomální konstituce .....	17
3.1.4.3 Jednodomé chmely a ploidie .....	18
<b>3.2 Mikrosatelity .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Klasifikace mikrosatelitů .....	19
3.2.2 Výskyt mikrosatelitů .....	21
3.2.3 Funkce mikrosatelitů.....	22
3.2.4 Mutační dynamika .....	23
3.2.4.1 Mechanismus mutací.....	23
3.2.4.2 Frekvence mutací .....	24
3.2.5 Mikrosatelity jako markery.....	25
3.2.5.1 Markery .....	25
3.2.5.2 Molekulární markery.....	25
3.2.5.3 Mikrosatelitní markery a jejich využití .....	26
<b>3.3 Chloroplasty a chloroplastové mikrosatelity .....</b>	<b>27</b>
3.3.1 Chloroplastová DNA .....	27
3.3.2 Chloroplastové mikrosatelity .....	29
<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Rostlinný materiál.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Izolace DNA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Kvalitativní a kvantitativní hodnocení DNA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Agarózová elektroforéza.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5 Kapilární elektroforéza .....</b>	<b>31</b>
<b>4.6 Bioinformatická analýza.....</b>	<b>32</b>
<b>4.7 Empirické ověření funkčnosti jednotlivých cpSSR markerů.....</b>	<b>32</b>
<b>4.8 Vývoj nového markeru pro lokus NTCP 8 .....</b>	<b>33</b>
4.8.1 Podmínky amplifikace lokusu NTCP 8 určeného k sekvenaci.....	33

4.8.2	Sekvenační reakce.....	34
4.8.3	Purifikace po sekvenační reakci .....	34
4.8.4	Sekvenace .....	35
4.8.5	Vývoj a optimalizace nového primeru pro lokus NTCP 8.....	35
<b>4.9</b>	<b>Multiplex PCR.....</b>	<b>36</b>
4.9.1	Multiplex M1 .....	36
4.9.2	Multiplex M2 .....	37
<b>4.10</b>	<b>Statistická analýza.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Výsledky bioinformatické analýzy.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Výsledky sekvenace lokusu pro marker NTCP 8.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>Výsledky optimalizace a tvorby multiplexů.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4</b>	<b>Výsledky statistické analýzy.....</b>	<b>46</b>
5.4.1	Deskriptivní statistika .....	46
5.4.1.1	Celková variabilita .....	46
5.4.1.2	Variabilita mezi kulturními a planými chmely.....	47
5.4.1.3	Variabilita chmelů členěných podle bioregionů.....	48
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Bioinformatická analýza.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2</b>	<b>Optimalizace cpSSR markerů.....</b>	<b>50</b>
<b>6.3</b>	<b>Studium diverzity a variability chmele .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Seznam obrázků a tabulek.....</b>	<b>68</b>
9.1	Seznam obrázků .....	68
9.2	Seznam tabulek.....	68
<b>10</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>70</b>

# 1 Úvod

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) je dvoudomá vytrvalá rostlina, která se používá především v pivovarnictví. Chmelové šišťice, rostoucí na samičích rostlinách, obsahují pryskyřice a silice, které přispívají k hořkosti piva. Český chmel, pěstovaný dnes v Žatecké, Ústěcké a Tršické oblasti, má dlouholetou tradici a je celosvětově známý díky své kvalitě.

V této diplomové práci se věnuji zkoumání diverzity u chmele. Genetická diverzita má velký význam nejen globálně, ale i v rámci druhu, jelikož přispívá k jeho stabilitě, přežití i dalšímu vývoji. Diverzita je významná např. také při tvorbě nových odrůd a obecně ve šlechtitelství, kde genetická různorodost zvyšuje šance na šlechtitelský úspěch.

Ke studiu diverzity se díky svým vlastnostem, jakými jsou např. relativně četný výskyt v genomu nebo polymorfismus, hojně využívají mikrosatelitní markery, které se podle výskytu v různých typech genomu mohou dělit na jaderné (nuSSR), mitochondriální (mtSSR) a chloroplastové (cpSSR).

Ačkoliv mohou být chloroplastové mikrosatelity důležitým zdrojem informací k hodnocení diverzity, doplňujícím informace získané z jaderných a mitochondriálních mikrosatelitních markerů, u chmele byly dle dostupných zdrojů k tomuto účelu použity pouze jednou. Proto se právě jimi zabývá tato diplomová práce. Vychází se v ní z předpokladu, že chloroplastová DNA je konzervativní a z toho důvodu bude možné použít ke zkoumání genetické diverzity u chmele chloroplastové mikrosatelity navržené původně pro jiný druh, kterým je v případě této práce tabák (*Nicotiana tabacum* L.).



## 2 Cíle práce

### 2.1 Vědecké hypotézy

- V současné době je u chmele známo velice málo chloroplastových mikrosatelitů, ale vzhledem k vysoké konzervativnosti chloroplastového genomu by mělo být možné aplikovat na chmel markery navržené pro příbuzné rostliny.
- Chloroplastové mikrosatelity poskytují nový zdroj dat ke zkoumání diverzity chmele.

### 2.2 Cíle práce

- Provést bioinformatickou analýzu dat pomocí genetických databází.
- Empiricky ověřit funkci vybraných markerů na testovacích vzorcích chmele.
- Provést optimalizaci podmínek pro amplifikaci získaných markerů.
- Vyhodnotit diverzitu chmele na kolekci planých chmelů pocházejících z genobanky Chmelařského institutu s. r. o., v Žatci.

### 3 Přehled literárních poznatků

#### 3.1 Chmel (*Humulus lupulus* L.)

##### 3.1.1 Systematika chmele

Chmel (*Humulus lupulus* L.) patří do řádu kopřivotvarých (*Urticales*), do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) (Zázvorka et Zima, 1956).

Různí autoři uvádějí odlišné způsoby systematického členění chmele (*Humulus* L.). Vent a kol. (1963) rozeznávají čtyři druhy rodu chmel (*Humulus* L.):

- *Humulus lupulus* L. – chmel otáčivý neboli evropský
- *Humulus americanus* (Nuttal) – chmel americký
- *Humulus japonicus* (Sieb. et Zucc.) – chmel japonský
- *Humulus scandens* (Lour. et Merrill.) – chmel oplétavý

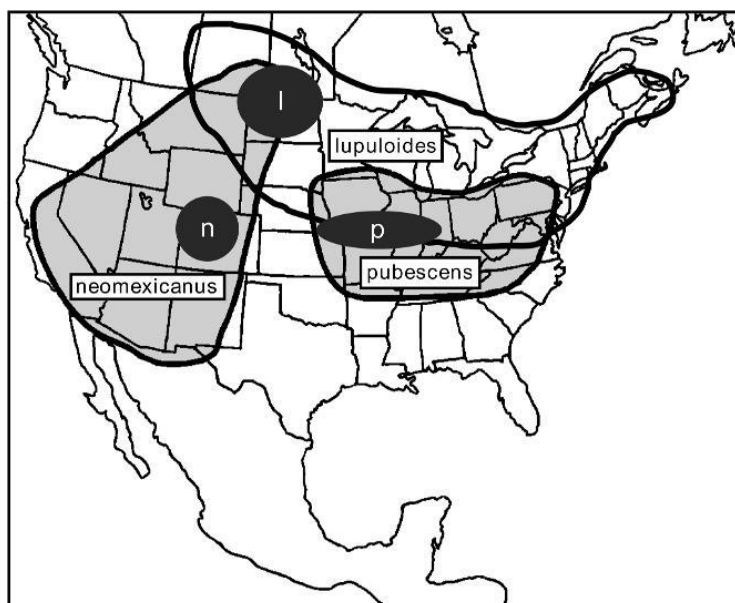
Uvádí také několik variet v rámci druhu *Humulus lupulus* L.:

- *Humulus lupulus cordifolius* (Miguel)
- *Humulus lupulus neomexicanus*
- *Humulus lupulus* var. *irenae minima* (Blattný)

Small (1978) odlišuje pět variet chmele otáčivého:

- *Humulus lupulus* ssp. *lupulus*, původem z Evropy
- *Humulus lupulus* ssp. *neomexicanus* (Nels. et Cockerell) – chmel novomexický
- *Humulus lupulus* ssp. *pubescens* (E. Small), s výskytem v Severní Americe
- *Humulus lupulus* ssp. *lupuloides* (E. Small), s výskytem v Severní Americe
- *Humulus lupulus* ssp. *cordifolius* (Miguel) – chmel srdčitolistý, s výskytem v Asii

Rozdělení dle Small (1978) bylo podpořeno studií Reeves et Richards (2011), která se zabývala analýzou severoamerických variet znázorněných na obrázku 1. V rámci této studie byly potvrzeny výrazné rozdíly mezi uvedenými varietami.



**Obr. 1** Ohraničené oblasti ilustrují přibližná místa výskytu tří severoamerických variet *Humulus lupulus* L. určených dle Small (1978). Šedé oblasti představují místo odběru vzorků jednotlivých variet, písmenné označení odpovídá prvnímu písmenu příslušné variety (Reeves et Richards, 2011)

Rybáček a kol. (1980) uvádí tři druhy chmele, které odlišují počtem chromozomů:

- *Humulus lupulus* L. – chmel otáčivý
- *Humulus japonicus* (Sieb. et Zucc.) – chmel japonský
- *Humulus scandens* (Lour. et Merrill.) – chmel oplétavý

Druh *Humulus lupulus* L. rozděluje na tři poddruhy:

- *Humulus lupulus* ssp. *neomexicanus* (Nels. Et Cockerell) – chmel novomexický
- *Humulus lupulus* ssp. *cordifolius* (Maxim) – chmel srdčitolistý
- *Humulus lupulus* ssp. *europaeus* (Ryb.) – chmel evropský

A dále u chmele evropského rozlišují tři variety:

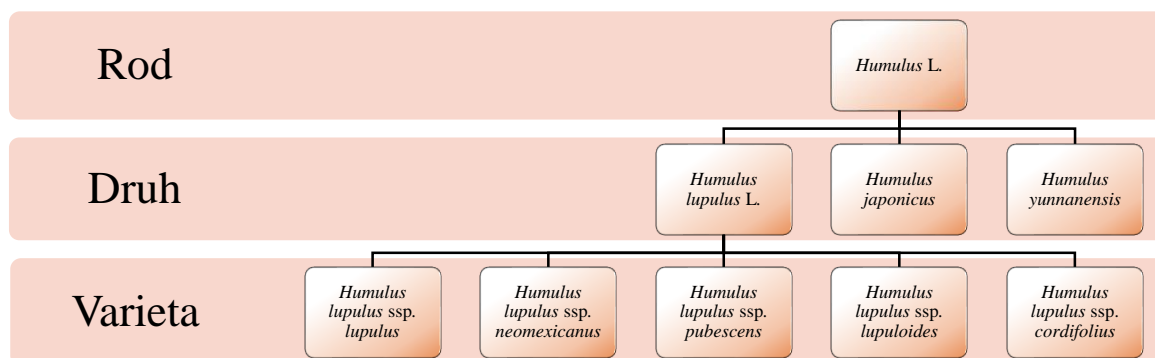
- var. *irenae minima* (Blatt.) – zakrslý
- var. *spontanea* (Ryb.) – planý
- var. *culta* (Ryb.) – kulturní

Vent a kol. (1963) uvádí, že chmel kulturní vznikl z chmele planého, což dokládají shodným počtem chromozomů, stejným způsobem rozmnožování, víceletostí a absencí rozdílů ve většině základních biologických vlastností.

Neve (1991) v rámci rodu *Humulus* L. uvádí tři druhy chmele:

- *Humulus lupulus* L. – chmel otáčivý
- *Humulus japonicus* (Sieb. et Zucc.) – chmel japonský
- *Humulus yunnanensis* – chmel junnanský

V současné době se ve vědecké literatuře obvykle používá členění dle Small (1978), znázorněné na obrázku 2.



**Obr. 2** Obecně uznávaná systematika chmele (Small, 1978; Neve, 1991)

### 3.1.2 Historie pěstování chmele

Pěstování chmele má v Česku dlouholetou tradici. Planě rostoucí chmel byl znám už ve starověku jako léčivá rostlina (Zázvorka et Zima, 1956; Pastyřík, 1989). Kulturní forma chmele se ale vyskytuje až ve středověku (Zázvorka et Zima, 1956) a její pěstování je spjata s výrobou piva (Pastyřík, 1989).

Přesné datování začátku používání chmele jako kulturní plodiny není doložené. Je ale pravděpodobné, že chmelení nápojů bylo známé již v době pronikání slovanských kmenů na území dnešní střední Evropy, a to hlavně v oblastech bývalého Ruska, odkud se pak šířilo dále do Evropy. První písemné zprávy o chmelu jsou z 8. a 9. století, na našem území z roku 859. Od 10. a 11. století zmínek o chmelu podstatně přibývá (Vent a kol., 1963).

Významným obdobím pro české chmelařství byl počátek předminulého století, kdy byly české země proslavené svým vysoce jakostním chmelem, což přispělo k rozvoji zahraničního obchodu. Zvýšená poptávka po chmelu způsobila, že se jeho pěstování na našem území postupně soustředilo do nejvhodnějších oblastí (Pastyřík, 1989).

Od poloviny devadesátých let 20. století dochází ale ke zmenšování ploch, na kterých se chmel pěstuje. Důvodem jsou převážně nízká pěstitelská cena, zvyšující se náklady na pěstování i další faktory, jako např. věková struktura porostů chmele v ČR (Dvořák a kol., 2008). Dle dostupných údajů k datu 20. 8. 2014 registroval Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský nárůst sklizňových ploch chmelnic v České republice oproti roku 2013 o 141 hektarů, na celkových 4460 hektarů (ÚKZÚZ, 2014).

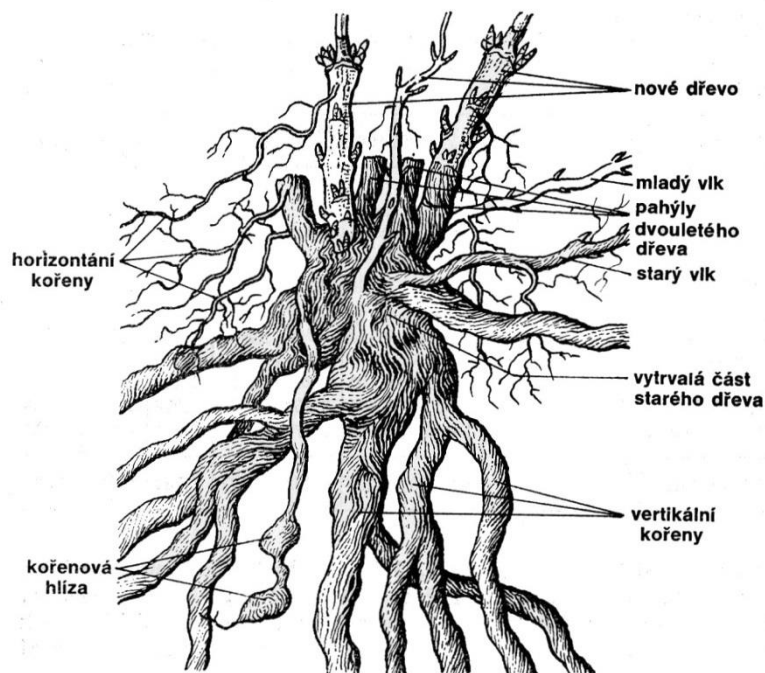
### 3.1.3 **Biologie chmele**

Chmel otáčivý je víceletá bylina s každoročně odumírajícími nadzemními orgány. Odumírání nastává před nástupem zimního období, zachovány zůstávají pouze vyspělé podzemní orgány (Rybáček a kol., 1980). Tato vytrvalá rostlina vytváří každoročně velké množství nadzemní hmoty, je mohutného vzrůstu a její kořenový systém je značně vyvinutý (Vent a kol., 1963). Chmel je pravotočivý, což znamená, že se jeho lodyha obtáčí kolem opory ve směru hodinových ručiček (Vent a kol., 1963).

U chmelových rostlin rozlišujeme čtyři orgánové soustavy – dvě podzemní, soustavu kořenovou a babku neboli soustavu podzemních lodyžních orgánů, a dvě nadzemní, soustavu nadzemních vegetativních a generativních orgánů.

V kořenovém systému dospělé rostliny se nachází 8–12 silně rozvětvených hlavních kořenů, které jsou kryty korovou vrstvou. Kořeny rostou z několikaletého zkráceného oddenku, tzv. babky. Babka každoročně přirůstá a stárím dřevnatí, vytrvává většinou 20–25 let, výjimečně i přes 50 let, a zároveň určuje délku života rostliny (Vent a kol., 1963). Základním předpokladem pro víceletost chmelových rostlin je schopnost spících pupenů vytrvat v životaschopném stavu po dobu čtyř let, přičemž všechny probuzené nebo staré pupeny jsou každoročně nahrazovány novými spícími pupeny (Rybáček a kol., 1980).

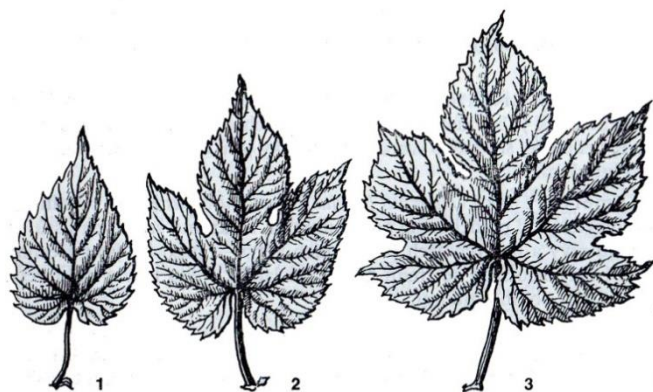
Hlavní kořeny zasahují velmi hluboko do spodních vrstev půdy a také se větví do šířky, čímž vzniká mohutný kořenový systém. Postranní kořeny mají hlavní význam pro příjem vody a živin z půdy. Na podzemní části jednoletých lodyh neboli rév se zakládají jednoleté, většinou horizontálně rostoucí, kořeny, které jsou rozprostřeny převážně v mělké vrstvě ornice. U dvouletých a víceletých rostlin vyrůstají z babky každoročně boční oddenky, zvané vlky, které jsou vlastně přeměněnými lodyhami. Vlky se při řezu chmele odstraňují. Pokud k tomuto odstranění nedojde, vzniká z každého vlku normální nadzemní rostlina, většinou mohutnějšího vzrůstu než rostlina pocházející z pupenů na babce (Vent a kol., 1963). Kořenový systém chmele je ilustrován na obrázku 3 (Rybáček a kol., 1980).



**Obr. 3** Podzemní část chmelové rostliny (Rybáček a kol., 1980)

Každoročně z pupenů na babce i na podzemní části loňských rév chmele vyrůstají nové révy, které vytrvají pouze jedno vegetační období (Vent a kol., 1963). U chmelových rostlin se lodyha rozděluje na hlavní révu a postranní větve neboli pazochy (Rybáček a kol., 1980). Na průřezu je réva šestiúhelníková a na jejích hranách je řada šplhavých chlupů, s jejichž pomocí se chmel přidrzuje opory (Vent a kol., 1963). Chlupy mají po ztvrdnutí tvar jednostranných či oboustranných háčků. Těmito křemičitými háčky se révy zachycují i na poměrně hladkých oporách (Rybáček a kol., 1980). Růst chmelové révy do délky je velmi intenzivní, dosahuje maximálních přírůstků až přes 30 centimetrů za 24 hodin (Vent a kol., 1963).

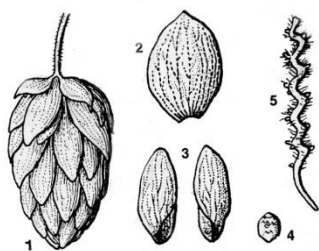
Listy u chmele vyrůstají z uzlin révy a pazochů, zpravidla po dvou vstřícně proti sobě. Dělí se na listy révové a pazochové. Révové listy obvykle vyrůstají dříve a bývají větší. Oba typy listů jsou řapíkaté, listové čepele jsou u mladých listů silně zřasené, zatímco u vyvinutých listů jsou mírně zprohýbané. Okraje mohou být pilovité či dlanitě laločnaté. Mladé listy mají srdčitý tvar, dospělé révové listy jsou obvykle pětilaločnaté nebo sedmilaločnaté. Pazochové listy mohou být celistvé, třílaločnaté či pětilaločnaté. Žilnatina je dlanitá, žilky na spodní straně listu vytvářejí žebra, na nichž stejně jako na révách vznikají křemičité háčky. Svrchní strana listů je temně zelená, spodní bývá světlejší (Rybáček a kol., 1980). Typy listů chmele jsou ilustrovány na obrázku 4 (Rybáček a kol., 1980).



Listy chmele otáčivého: 1 – list srdčitý, 2 – třílaločný, 3 – pětילוčný.

**Obr. 4** Listy chmele otáčivého (Rybáček a kol., 1980)

Přechod z vegetativní do reprodukční fáze je u samičích rostlin spuštěn zkracující se délkou dne. Potřebná délka dne je závislá na genotypu rostliny (Thomas et Schwabe, 1969). Z vrcholového pupenu révy a z pupenů plodných pazochů vznikají květenství, tzv. osýpky. U samičích rostlin se přeměňují na plodenství, které se v chmelařském názvosloví označuje jako hlávka či botanicky šištice, jejíž součástí jsou lupulinové žlázy. Chmelová hlávka je ilustrována na obrázku 5 (Rybáček a kol., 1980). Z oplozených květů se tvoří plody, kterými jsou jednosemenné nažky běžně známé pod pojmem pecky. Změna květenství na plodenství nastává v době, kdy zaniká schopnost blizen přijímat pyl, a to i tehdy, pokud květ nebyl oplozen (Rybáček a kol., 1980).

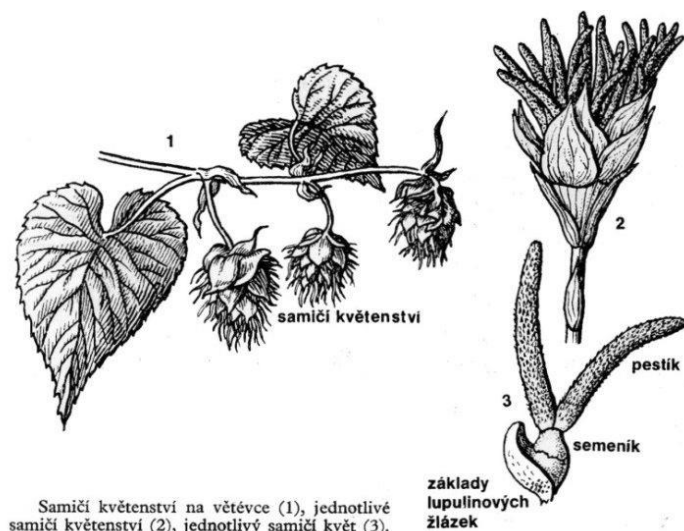


Hlávka a její části: 1 – hlávka, 2 – krycí listen, 3 – pravé listeny, 4 – nažka, 5 – vřeténko.

**Obr. 5** Hlávka a její části (Rybáček a kol., 1980)

Je známé, že se samčí a samičí květy chmele liší svou strukturou, ale jejich raná vývojová stádia nejsou příliš důkladně prozkoumána. V prvních dvou fázích vývoje jsou samčí i samičí květy zcela identické (Shephard et al., 2000). V pozdějších stádiích vývoje je ale morfologie samičích a samčích květů velmi odlišná. Samičí rostliny jsou uspořádány v párech okolo mnohokrát zalomeného vřeténka do tvaru šištice, které obsahují 36 až 48 květů (Shephard et al., 2000). Na každém zalomení vřeténka se obvykle tvoří čtyři kvítky, každá dvojice kvítků je chráněna jedním krycím listem vzniklým z palistů (Rybáček a kol., 1980).

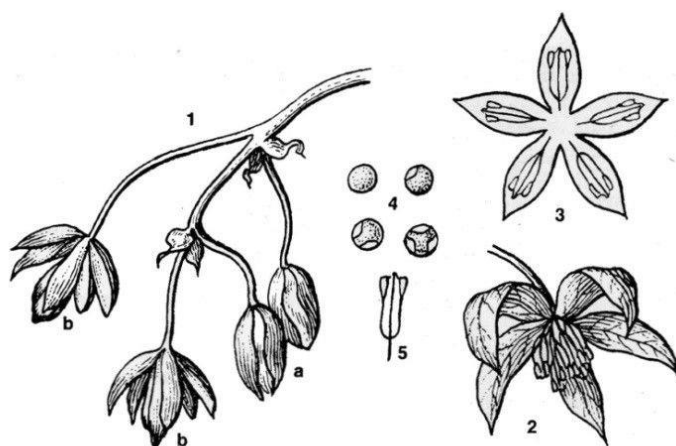
Každý kvítek má drobné, zeleně zbarvené pohárkovité okvětí a semeník s jedním vajíčkem, na který přisedají dvě nitkovité blizny s chybějícími čnělkami. Blizny jsou pokryté papilami, které zachycují pyl rozptýlený ve vzduchu, jsou bělavě zbarvené a při odumírání hnědnou (Rybáček a kol., 1980). Samičí květenství ilustruje obrázek 6 (Rybáček a kol., 1980).



Samičí květenství na větévce (1), jednotlivé samičí květenství (2), jednotlivý samičí květ (3).

**Obr. 6** Samičí květenství (Rybáček a kol., 1980)

Samčí květ se skládá z 5 kališních lístků a 5 tyčinek. Květenství je velmi odlišné od samičího, tvoří ho lata. Každá lata je složena z 20 až 100 jednotlivých květů (Shephard et al., 2000). Samčí květenství je ilustrováno na obrázku 7 (Rybáček a kol., 1980).



Samčí květenství (1) s poupaty (a) a květy (b), otevřený květ (2) a schéma květu (3), pylová zrna (4), prašník (5).

**Obr. 7** Samčí květenství (Rybáček a kol., 1980)



### 3.1.4 Genetika chmele

#### 3.1.4.1 Velikost genomu

Grabowska-Joachimiak et al. (2006) ve své studii zjistili u diploidní samičí rostliny evropského chmele velikost chmelového genomu 5,48 Gb. Tento výsledek je v souladu s pozdějšími výsledky studie Natsume et al. (2014), ve které byla určena velikost chmelového genomu v haploidní buňce 2,57 Gb. Při porovnání s fylogeneticky blízkým konopím (*Cannabis sativa* L.) je velikost chmelového genomu přibližně třikrát větší (van Bakel et al., 2011), ale celkový obsah genů kódujících proteiny je u obou rostlin srovnatelný (Natsume et al., 2014).

#### 3.1.4.2 Chromozomální konstituce

Kulturní odrůdy evropského chmele jsou diploidní, kde  $2n = 20$  chromozomů. Z tohoto počtu tvoří 1 pár pohlavní chromozomy a 9 párů autozomy. Pohlavní chromozomy tvoří u samic 2 chromozomy X a u samců chromozomy XY (Polley et al., 1997). Toto klasické uspořádání se nazývá chromozomální typ „Winge“ (Karlov et al., 2003). Dříve bylo velice obtížné charakterizovat karyotyp evropského chmele a odlišit všech deset párů chromozomů pouze na základě jejich morfologie. Použití metody FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) a DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) barvení umožnilo odlišit všech deset párů chromozomů včetně gonozomů u samčích a samičích rostlin. Jako nejkratší chromozom pozorovaný v metafázi u samčích rostlin byl určen chromozom Y a jako středně velký metacentrický chromozom byl určen chromozom X (Karlov et al., 2003).

Chromozomální konstituce blízkce příbuzného *Humulus japonicus* je charakterizována odlišným systémem pohlavních chromozomů. Samice mají  $2n = 14 + XX$ , zatímco samci mají  $2n = 14 + XY_1Y_2$  (Shephard et al., 2000). Toto chromozomální uspořádání je označováno jako typ „Sinoto“ (Karlov et al., 2003). V tomto uspořádání byl u samic jako největší určen téměř metacentrický chromozom X. Bylo také zjištěno, že chromozomy Y1 a Y2 jsou podobné tvarem i velikostí chromozomu X. Pohlaví rostlin lze odlišit v interfázi, kdy jádra samčích rostlin obsahují dvě chromocentra, která v samičích jádrech pozorovatelná nejsou. Během profáze mitózy je také možné odlišit Y1 a Y2 od chromozomu X díky jejich předčasné kondenzaci (Shephard et al., 2000).

U druhu *Humulus yunnanensis* nejsou údaje o chromozomálním uspořádání známy (Pillay et Kenny, 1994).

U dvou z výše zmiňovaných druhů rodu *Humulus* L. (*Humulus lupulus* L. a *Humulus japonicus*) je pohlaví rostlin určováno poměrem X:A, a ačkoliv chromozom Y není nezbytný pro produkci samčího fenotypu, jeho přítomnost je nezbytná pro životaschopnost pylu (Skof et al., 2012).

Podobná pohlavní determinace se vyskytuje také u konopí (*Cannabis sativa* L.), které je s chmelem příbuzné na úrovni čeledi a má s ním shodnou i chromozomální konstituci  $2n = 20$  chromozomů, samice (XX) a samci (XY) (Ming et al., 2011).

#### 3.1.4.3 Jednodomé chmely a ploidie

Předpokládá se, že dvoudomé rostliny se vyvinuly z předků s oboupohlavními květy (Westergaard, 1958). Většina kvetoucích rostlin je jednodomých, pouze okolo 6 % jsou rostliny dvoudomé (Renner et Ricklefs, 1995). Ačkoliv je chmel rostlina dvoudomá, občas se vyskytne i jednodomý jedinec. Výskyt jednodomých rostlin chmele je pravděpodobně způsoben změnami počtu chromozomů (Jakše et al., 2008).

Tento předpoklad potvrdili i Shephard et al. (2000), kteří zkoumali triploidní rostliny chmele s chromozomální konstitucí  $2n = 27 + XXY$  (poměr X:A 0,67), které byly převážně samčího charakteru s několika samičími terminálními květenstvími, a tetraploidní jedince, kteří měli chromozomy  $2n = 36 + XXXY$  (poměr X:A 0,75) a fenotypově nesli takřka srovnatelný počet samčích i samičích květů (Shephard et al., 2000).

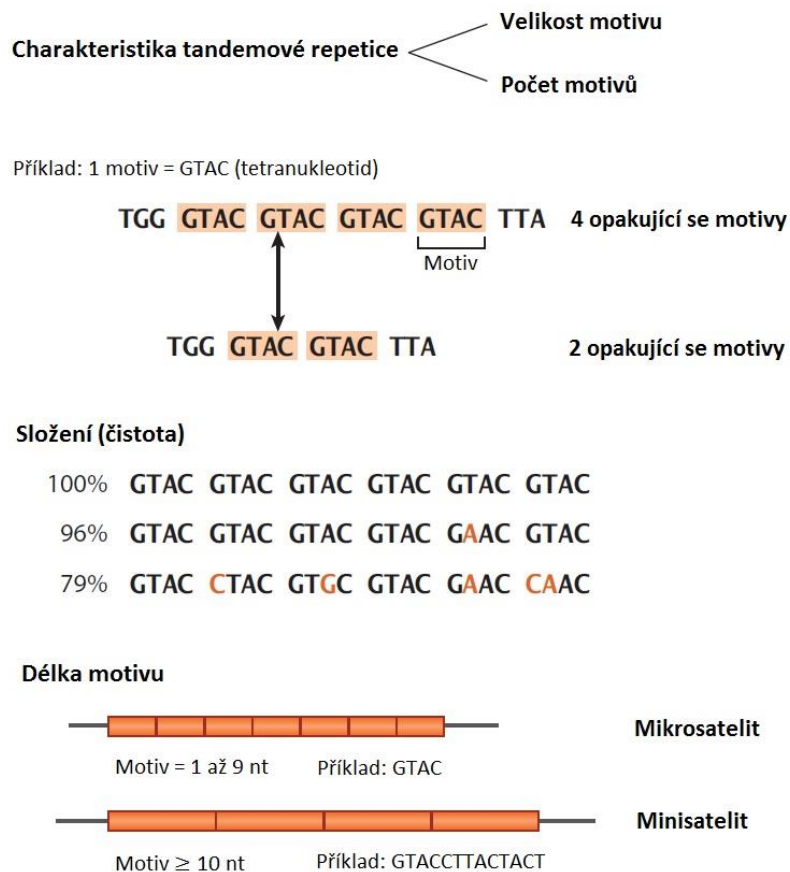
## 3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity, známé také pod názvy Simple sequence repeat (SSR) nebo Short tandem repeat (STR), jsou součástí repetitivní DNA, která tvoří značnou část genomu většiny eukaryotických organismů (Gemayel et al., 2010). Repetitivní DNA lze rozdělit na dvě velké skupiny. První skupinu představují roztroušené repetice, které obsahují různé třídy transponovatelných elementů, jako jsou DNA transpozony a retroelementy (Richard et al., 2008). Druhou skupinu tvoří tzv. tandemové repetice, do kterých spadají právě mikrosatelity (Richard et al., 2008), což jsou krátké tandemové repetice s opakujícím se motivem (Ellegren, 2004). Množství repetitivní DNA a mikrosatelitů se může mezi organismy značně lišit. Chmel obsahuje přibližně 34,7 % repetitivní DNA, z toho většinu (93 %) tvoří retrotranspozony (Natsume et al., 2014). Naproti tomu kukuřice (*Zea Mays* L.) obsahuje až 80 % repetitivní DNA (Whitelaw et al., 2003), z toho přibližně 20 % tvoří mikrosatelity (Sharopova et al., 2002). Dalším příkladem pro srovnání může být repetitivní DNA člověka, která představuje cca 46 % z celého genomu (Gemayel et al., 2010), z toho 3 % tvoří mikrosatelity (Fan et Chu, 2007).

### 3.2.1 Klasifikace mikrosatelitů

Klasifikace mikrosatelitů není jednotná a u různých autorů se značně liší. Např. Pokhriyal et al. (2012) definují mikrosatelity jako repetice dlouhé 1–5 nukleotidů, zatímco většina autorů se shoduje na délce 1–6 nukleotidů (Tóth et al., 2000; Chen et al., 2006; Jain et al., 2014). Někteří další autoři klasifikují mikrosatelity jako sekvence dlouhé i 9 (Legendre et al., 2007) či 11 nukleotidů (Mrázek et al., 2007). Pompanon et al. (2005) naopak zcela vyčleňují mononukleotidové repetice a za mikrosatelity tedy považují repetice dlouhé 2–6 nukleotidů.

Mikrosatelity nejsou definovány pouze délkou motivu, ale charakterizuje je i řada dalších znaků, jejichž základní přehled je znázorněn na obrázku 8.



**Obr. 8** Důležité charakteristiky tandemových repetic, upraveno dle Gemayel et al. (2010)

Jak je patrné z obrázku 8, důležitou vlastností je i celková délka mikrosatelitů, která v závislosti na počtu repetic může dosahovat až 100 nukleotidů (Fan et Chu, 2007). Z toho vyplývá, že i počet repetic je podstatný (Pokhriyal et al., 2012), přičemž ve většině případů platí, že čím je motiv repetic delší, tím méně má opakování (Subirana et Messeguer, 2008).

Kromě procentuálního hodnocení „čistoty“ mikrosatelitů, které uvádí Gemayel et al. (2010), se můžeme setkat i s jiným členěním, např. dle Jain et al. (2014), který dělí mikrosatelitní repetic podle jejich skladby do těchto kategorií:

- 1) dokonalé – sekvence není přerušena žádnou bází, která nepatří do motivu  
např. CGCGCGCGCGCGCGCG
- 2) nedokonalé – obsahují několik bází nepatřících do opakujícího se motivu  
např. CGCGCGCGCGCTCGCGCGCG
- 3) přerušené – vyskytuje se zde krátká sekvence odlišná od opakujícího se motivu  
např. CGCGCGCTTAGCGCGCGCG
- 4) složené – dvě či více přilehlých sekvencí lišících se motivem opakování  
např. CGCGCGCGCGGATATATATAT

V literatuře se můžeme setkat s různými druhy zápisu mikrosatelitů. Pokhriyal et al. (2012) uvádí jako příklad zápisu mononukleotidovou repetici AAAAAAAAAAAA, která může být zapsána jako (A)<sub>11</sub>, kde motivem je A a tento motiv je opakován 11x. Dalším příkladem tohoto zápisu je tetranukleotidový mikrosatelit ACTCACTCACTCACTC, který lze zkráceně zapsat (ACTC)<sub>4</sub>. V tomto druhu zápisu je zohledněno pouze jedno vlákno DNA, naproti tomu někteří další autoři používají zápis zohledňující obě vlákna DNA, který může vypadat např. AAG/CTT (Tóth et al., 2000; Victoria et al., 2011).

### 3.2.2 Výskyt mikrosatelitů

Zastoupení mikrosatelitů se v různých částech genomu liší. Nejvíce mikrosatelitních repetic se nachází v nekódujících oblastech – v intronech nebo intergenových oblastech (Subirana et Messeguer, 2008). Obecně jsou v nekódujících oblastech nejrozšířenější dinukleotidové repetice (Chistiakov et al., 2006), výjimku tvoří primáti, u kterých převládají mononukleotidové repetice (Tóth et al., 2000). Kódující oblasti – exony jsou na mikrosatelity chudší, obsahují přibližně 8 % z celkového množství (Fan et Chu, 2007), ale jejich denzita je vyšší (Morgante et al., 2002). V kódujících oblastech u mnoha organismů převažují trinukleotidové repetice, pravděpodobně proto, že na rozdíl od jiných typů mikrosatelitů nezpůsobují posuny čtecího rámce (Kalia et al., 2011). Vysoká denzita mikrosatelitů je i v UTR (= untranslated regions) oblastech (Lawson et Zhang, 2006). Rozdíly existují také v zastoupení mikrosatelitů v různých částech chromozomů. Nižší výskyt mikrosatelitních repetic je typický zejména pro centromerické oblasti, kde se vyskytuje 2–5x méně mikrosatelitů než v jiných částech chromozomu (Guo et al., 2009).

Bylo prokázáno, že mezi různými organismy jsou rozdíly v počtu i typu mikrosatelitů (Oliveira et al., 2006; Guo et al., 2009). Konkrétní příklady procentuálního zastoupení mikrosatelitů u různých organismů jsou uváděny v kapitole 3.2. Obecně lze konstatovat, že s rostoucí velikostí genomu dochází ke snižování počtu mikrosatelitních sekvencí (Morgante et al., 2002).

Pro různé organismy bývá charakteristické určité zastoupení některých motivů. Victoria et al. (2011) tvrdí, že u rostlin jsou celkově nejrozšířenější dinukleotidové motivy AG/CT a GA/TC. Jako nejčastější trinukleotidové motivy byly v rámci této studie určeny AAG/CTT a GCA/TGC. V této studii jsou také podrobněji uvedeny typické di- a trinukleotidové motivy pro řasy, nižší a vyšší rostliny. U řas jsou nejvíce zastoupené dinukleotidové motivy AC/GT a CA/TG a trinukleotidové motivy GCA/TGC, CAG/CTG

a GCC/GGC. Pro nižší rostliny jsou typické motivy AG/CT, AT/AT a GA/TC a z trinukleotidů potom motivy GCA/TGC a CAG/CTG. Dinukleotidy AG/CT a GA/TC převažují u vyšších rostlin, z trinukleotidových motivů se u nich nejvíce vyskytují AAG/CTT, AGA/TCT, GGA/TCC a GAA/TTC. Autoři došli k závěru, že celkově jsou u rostlin tetra-, penta- a hexanukleotidové motivy mnohem vzácnější než motivy di- a trinukleotidové, což je v souladu s výsledky dříve proběhlé studie von Stackelberg et al. (2006).

V genomu chmele jsou nejvíce zastoupeny dinukleotidy GA a GT (Brady et al., 1996), toto tvrzení však nemusí být platné pro všechny chmelové rostliny, jelikož relativní zastoupení mikrosatelitů se může u různých variet lišit (Brady et al., 1996).

### 3.2.3 Funkce mikrosatelitů

V minulosti se často předpokládalo, že mikrosatelitní repetic nemají významnou biologickou funkci. V dnešní době je ale známo, že ve skutečnosti je role řady mikrosatelitních lokusů u mnohých organismů velmi důležitá. Funkce SSR může být různá v závislosti na jejich umístění v genomu (Fan et Chu, 2007).

Mikrosatelity umístěné v kódujících oblastech mohou ovlivňovat aktivaci genu a tím i expresi proteinu (Kalia et al., 2011). Příkladem mohou být některé geny patogenních bakterií obsahující mikrosatelitní sekvence, které mohou způsobovat posun čtecího rámce a tím vést ke změně exprese nebo skladby vznikajících proteinů (Fan et Chu, 2007).

Změny v expresi mohou způsobovat také mikrosatelity umístěné v nekódujících oblastech (Lawson et Zhang, 2006) či v 5' UTR oblastech (Li et al., 2004). Jako příklad lze uvést rýži, kde je obsah amylózy závislý na množství GA či CT repetic v 5' UTR oblasti genu waxy (Bao et al., 2002). Dalším příkladem může být kukuřice, u které bylo zjištěno, že se mikrosatelit (CCG)<sub>n</sub> v oblasti 5' UTR genu pro ribozomální protein podílí na regulaci oplození (Dresselhaus et al., 1999).

Ačkoliv již byly některé funkce mikrosatelitů objeveny, mnoho z nich zatím zůstává nejasných. Pro hlubší porozumění je proto zapotřebí ještě dalších studií (Varshney et al., 2005).

### 3.2.4 Mutační dynamika

U mikrosatelitů dochází ke snižování či zvyšování počtu repetice, tyto mutace jsou jedním z faktorů, které ovlivňují evoluci mikrosatelitní DNA (Oliveira et al., 2006). Mutační dynamika mikrosatelitů je komplexní a složitý systém, ovlivňovaný řadou různých jevů, a z toho důvodu budou v této kapitole zmíněny pouze základní a nejdůležitější prvky této problematiky.

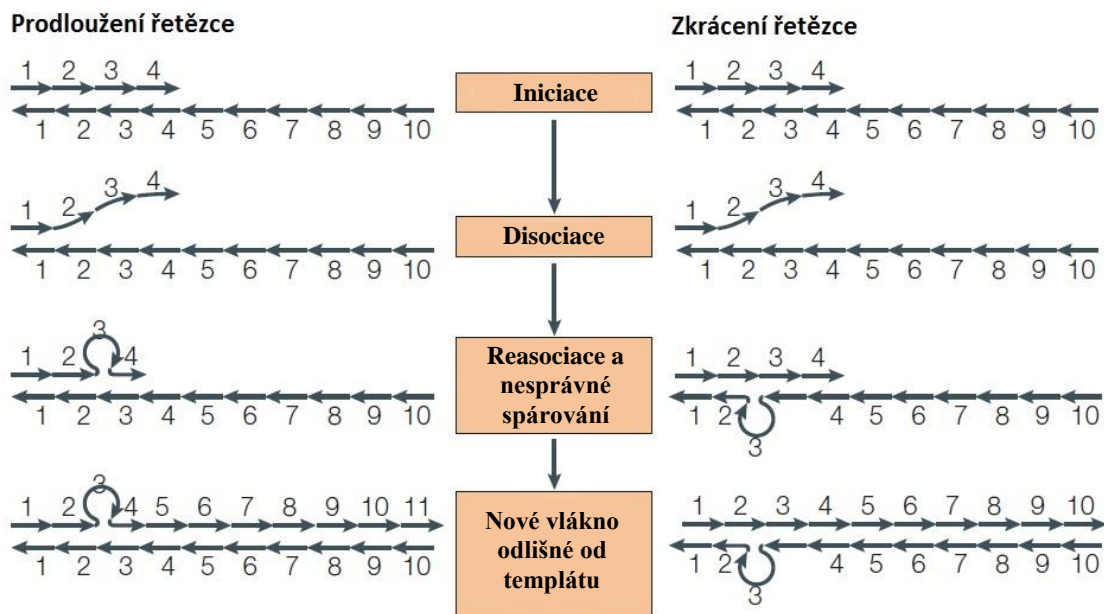
#### 3.2.4.1 Mechanismus mutací

Fan et Chu (2007) uvádí tři možné mechanismy mutací u mikrosatelitů:

- 1) Replikační sklouznutí
- 2) Nerovnoměrný crossing over při meióze
- 3) Retrotranspoziční mechanismus

Z těchto tří mechanismů se jako nejčastější příčina mutací jeví replikační sklouznutí (polymerase slippage, strand-slippage replication či SSM = single strand mispairing) (Levinson et Gutman, 1987). Další dva mechanismy jsou považovány spíše za minoritní, proto bude v této kapitole popsán pouze mechanismus replikačního sklouznutí. K tomuto jevu může docházet během replikace či opravy DNA, kdy po rozvolnění dvoušroubovice (tzv. disociace) utvoří uvolněná část vlákna, dlouhá 1 či více repetice, smyčku, v důsledku čehož následně dochází k opětovnému spojení dvoušroubovice (tzv. reasociace) v nesprávné části vlákna. V závislosti na tom, na kterém vlákně se smyčka utvoří, dochází buď k prodlužování, nebo ke zkracování řetězce. Pokud dojde ke vzniku smyčky u nově vznikajícího vlákna, je výsledkem prodloužení řetězce oproti původní předloze. Vznik smyčky u templátového vlákna vede naopak ke snížení počtu repetice (Oliveira et al., 2006). Celý proces je ilustrován na obrázku 9.

K jevu podobnému replikačnímu sklouznutí dochází také při amplifikaci mikrosatelitních lokusů pomocí PCR, kde v důsledku tohoto děje dochází ke vzniku tzv. koktavých produktů (Ellegren, 2004).



**Obr. 9** Mechanismus replikačního sklouznutí, upraveno dle Ellegren (2004), číslice 1–10 představují repetice opakujícího se motivu

#### 3.2.4.2 Frekvence mutací

Frekvence mutací je u mikrosatelitů velmi variabilní. Odlišnosti existují mezi různými lokusy, alelami i mezi organismy (Ellegren, 2004). Množství mutací se může lišit také v závislosti na velikosti motivu, jako příklad lze uvést zjištění, že u člověka je četnost mutací tetranukleotidů ve srovnání s dinukleotidy o 50 % nižší (Chakraborty et al., 1997). Důležitým faktorem ovlivňujícím četnost mutací je také délka mikrosatelitů, kde se zvyšujícím se počtem opakování motivu dochází ke zvyšování počtu mutací. Toto tvrzení může být podpořeno myšlenkou, že větší počet opakování motivu dává větší příležitost pro vznik replikačního sklouznutí (Pearson et al., 2005).

Dalším příkladem rozdílného výskytu mutací je frekvence mutací u unikátních sekvencí DNA, která je velmi nízká, přibližně  $10^{-9}$  nukleotidů na generaci (Ellegren, 2000), zatímco u SSR sekvencí je tato frekvence o několik řádů vyšší. Typicky se pohybuje v rozmezí od  $10^{-6}$  do  $10^{-2}$  nukleotidů na generaci (Schlötterer, 2000). Jak už bylo naznačeno, frekvenci mutací ovlivňuje řada jevů, je proto důležité také uvést, že většina mutací je *in vivo* opravena systémem MMR (mismatch repair system), který dokáže četnost mutací snížit 100 až 1000x (Fan et Chu, 2007), tudíž pouze zlomek z původního množství má skutečný charakter mutace (Ellegren, 2004).

Mutace mikrosatelitů mohou mít reálné dopady na organismus, což je nejlépe prostudováno u člověka, kde je tendence mikrosatelitů k mutacím, tedy jejich nestabilita,



spojována s více než 40 neurologickými, neurodegenerativními a neuromuskulárními onemocněními (Pearson et al., 2005). Mezi nemoci způsobované změnami v počtu mikrosatelitů patří např. Huntingtonova choroba, spinální svalová atrofie nebo syndrom křehkého chromozomu X (Gemayel et al., 2010).

### 3.2.5 Mikrosatelity jako markery

#### 3.2.5.1 Markery

Genetický marker je gen nebo sekvence DNA se známým umístěním na chromozomu, který se používá k identifikaci jednotlivce nebo druhu (Jain et al., 2014).

Dle Pokhriyal et al. (2012) můžeme markery rozdělit do 3 skupin podle úrovně, na které detekují polymorfismus:

- 1) Fenotypové či morfologické markery – odpovídají kvantitativním viditelným znakům
- 2) Biochemické markery
- 3) Molekulární markery – určují rozdíly mezi sekvencemi DNA

#### 3.2.5.2 Molekulární markery

Molekulární marker je druh genetického markeru, kterým lze určit polymorfismus na úrovni DNA (Jain et al., 2014).

Jak uvádí Pokhriyal et al. (2012), požadované vlastnosti molekulárních markerů jsou:

- 1) Polymorfismus – možnost měření variability
- 2) Rovnoměrné rozmístění v celém genomu
- 3) Rychlá a snadná detekce
- 4) Kodominance – lze rozpoznat homozygoty od heterozygotů

Molekulární markery lze členit na základě řady kritérií, jedním z nich je rozdělení podle Varshney et al. (2007):

- 1) Markery založené na hybridizaci DNA
- 2) Markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR)

Jedním z typů molekulárních markerů založených na PCR jsou mikrosatelitní markery, které můžeme dále dělit na markery I. a II. typu. Markery I. typu, nazývané EST-SSR nebo genové mikrosatelity, se vyskytují v transkribovaných oblastech a jsou asociovány se známými genovými sekvencemi. Výhoda těchto markerů je, že umožňují zanechat pozici

genů na genové mapě a mohou poskytovat informace o případné funkci či vlivu na daný gen. Nevýhodou je jejich nižší variabilita, z důvodu vyšší konzervativnosti sekvencí, a výskyt pouze ve 2 až 5 % genů (Varshney et al., 2005).

Genomické SSR neboli markery II. typu jsou anonymní sekvence v nekódujících oblastech. Uplatňují se zejména u málo prostudovaných organismů (Wang et al., 2004). Jejich výhodou je, že nebývají ovlivněny selekcí a mutace u nich probíhá jen náhodně.

### 3.2.5.3 Mikrosatelitní markery a jejich využití

Výhodou mikrosatelitních markerů je to, že splňují všechny čtyři vlastnosti uváděné v bodě 3.2.5.2, což neplatí pro některé další typy markerů, jako jsou např. AFLP a RAPD (Pokhriyal et al., 2012). SSR markery mají velmi široké uplatnění, některé z příkladů jejich aplikace jsou uvedeny v této kapitole.

Mezi praktické výhody mikrosatelitních markerů patří relativně snadná příprava vzorků a použití PCR, díky čemuž lze analyzovat i vzorky o nízké koncentraci DNA či s degradovanou DNA. Toho se využívá zejména v odvětvích, jako je forenzní věda, kde jsou mikrosatelity nejčastěji používanými genetickými markery, a to hlavně k identifikaci zločinců, určování otcovství nebo hledání pohřešovaných osob (Jain et al., 2014). Rozvíjejícím se oborem je také forenzní botanika, která používá SSR markery k určování rostlinného materiálu nalezeného na místě činu a tím přispívá k vyšetřování zločinů (Craft et al., 2007). Na podobném principu jsou mikrosatelitní markery používány u rostlin, kde se tímto způsobem může určovat odrůdová pravost (Gilmore et al., 2007). V praxi se SSR používají např. ke sledování autenticity a původu olivových olejů (Ben-Ayed et al., 2012). Pro snížení nákladů a času analýzy je možné používat tzv. multiplexování, což je metoda, při které dochází ke společné amplifikaci více mikrosatelitů v jedné PCR reakci (Guichoux et al., 2011).

Chistiakov et al. (2006) uvádí, že jednu z hlavních oblastí využití SSR markerů představuje genetické mapování. Varshney et al. (2005) udává, že je pro tvorbu genových map výhodné kombinovat markery I. a II. typu. Markery II. typu umožňují zmapovat velké části chromozomů a představují tak celkový rámec mapy, zatímco markery I. typu jsou používány pro určení přesného umístění genů v rámci vazbové mapy a tím se vzájemně doplňují (Chistiakov et al., 2006). V praxi lze těchto metod využít k mapování užitečných genů či k MAS neboli markerově asistované selekci (Mohan et al., 1997). Koelling et al. (2012) uvádí, že MAS je jednou z možností, jak spojit molekulární markery se sledovanými

vlastnostmi, jakými jsou například obsah hořkých a aromatických látek u chmele, odolnost proti hmyzu či pohlaví rostlin.

Dalším příkladem aplikace SSR markerů jsou populační studie, v nichž může být díky variabilitě mikrosatelitů v populaci zkoumána její velikost, struktura a dopady různých jevů, jako jsou např. genetický drift či efekt hrdla lahve (tzv. bottleneck efekt). Určovány mohou být také rozdíly mezi jedinci (Stàgel et al., 2008; Putman et Carbone, 2014).

Podobným způsobem jsou SSR markery používány i v rámci fylogeografických studií, a to zejména ke zkoumání biogeografické a genetické historie organismů v geograficky rozsáhlých oblastech (Chistiakov et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Jednou z dalších možností využití mikrosatelitů je určování stupně příbuznosti různých jedinců či skupin, což je v praxi využíváno pro hodnocení úrovně příbuznosti při plemenitbě chovaných nebo ohrožených druhů a ve šlechtitelských programech (Gupta et Varshney, 2000).

Nezanedbatelným oborem, kde jsou mikrosatelity hojně využívány, je také medicína. Zde se používají jednak k diagnóze a identifikaci různých nemocí, ale také k včasnému určování některých typů rakoviny, jako je rakovina močového měchýře nebo kolorektální karcinom (Søreide et al., 2006; Wild et al., 2009).

### **3.3 Chloroplasty a chloroplastové mikrosatelity**

#### **3.3.1 Chloroplastová DNA**

Ke vzniku rostlinné eukaryotické buňky, tak jak ji známe dnes, došlo před více než miliardou let spojením eukaryotické buňky s volně žijící cyanobakterií (sinice). Z této cyanobakterie se postupně během evoluce stal typ buněčné organely – chloroplast (McFadden, 2001). Genetickými a biochemickými studiemi bylo odhaleno, že v porovnání s volně žijícími předky jsou dnešní genomy plastidů menší, obsahují pouze okolo 5–10 % původního množství genů (Martin et al., 2002). Důvodem může být to, že řada genů z původní buňky sinice byla převedena do jádra, které kontroluje a reguluje procesy probíhající v chloroplastech (Bock et Timmis, 2008). Kromě toho také došlo během evoluce k přenosu některých genů z chloroplastů do mitochondrií (Cummins et al., 2003) a řada dalších vymizela úplně (Xiong et al., 2009).

Chloroplasty jsou v souladu s endosymbiotickým původem označovány jako semiautonomní, protože obsahují vlastní genetickou informaci včetně struktur zajišťujících transkripci a translaci (Xiong et al., 2009). Z toho vyplývá, že kromě genomu jaderného se

v rostlinných buňkách nachází i genom chloroplastový (plastidový), tzv. plastom (cpDNA) (Snustad et al., 2009).

Chloroplastová DNA obsahuje jak strukturní geny kódující proteiny, např. gen pro velkou podjednotku enzymu Rubisco (Khanna, 1990) a také geny pro funkční RNA např. geny pro tRNA či rRNA (Khanna, 1990). Uspořádání genů v chloroplastové DNA je napříč různými taxony poměrně konzervativní (Xiong et al., 2009). Replikace cpDNA probíhá nezávisle na replikaci jaderné DNA, ale je kontrolována jádrem, jelikož funkční chloroplasty jsou závislé na koordinované aktivitě produktů jaderných i chloroplastových genů (Snustad et al., 2009). Tradičně se předpokládá, že plastidové genomy existují ve formě kružnicových molekul (Bendich, 2004) obsahujících jeden pár invertovaných repetitiv (IR – inverted repeat) různé délky, které rozdělují genom na oblast LSC (large single-copy region) a oblast SSC (small single-copy region) (Higgs, 2009). Ve skutečnosti jsou však zřejmě převažující strukturou lineární větvené komplexní molekuly DNA (Bendich, 2004).

Chloroplastová dědičnost se liší od jaderné tím, že je uniparentální, ve většině případů matroklinní, u některých druhů se ale také může objevovat dědičnost patroklinní. Obvykle se matroklinní dědičnost vyskytuje u krytosemenných a patroklinní u nahosemenných rostlin (Provan et al., 2001; Navascues et Emerson, 2005; Petit et al., 2005).

Ve srovnání s jadernou DNA jsou cpDNA relativně malé dvouvláknové molekuly. Natsume et al. (2014) uvádí, že u japonského kultivaru chmele Shinshu Wase je velikost cpDNA 180 204 bp, což je přibližně 14x méně oproti jaderné DNA chmele (Natsume et al., 2014). Rozdíly mohou být ale mnohem větší, jako příklad lze uvést velikost jaderného genomu hexaploidní pšenice (*Triticum aestivum* L.) 17 Gb (IWGS Consortium, 2014) a velikost jejího chloroplastového genomu 134 540 bp (Ogihara et al., 2000).

Buňky rostlin obsahují různé počty chloroplastů, v nichž je přítomno mnoho kopií chloroplastové DNA. Jejich počet je závislý na typu buňky a liší se u různých druhů. Např. v jednobuněčné řase *Chlamydomonas reinhardtii* se nachází pouze jeden chloroplast, který obsahuje přibližně 80–100 kopií cpDNA (Higgs, 2009; Snustad et al., 2009). Plastomy mohou obsahovat velkou část celkové buněčné DNA, např. špenát (*Spinacia oleracea* L.) obsahuje až 13 000 cpDNA na buňku, což představuje 23 % z celkového obsahu DNA (Lawrence et Possingham, 1986).

### 3.3.2 Chloroplastové mikrosatelity

Jak už bylo naznačeno, převážná část mikrosatelitů se nachází v jádře, nicméně mikrosatelitní lokusy se vyskytují také v mitochondriích (Rajendrakumar et al., 2007) a chloroplastech (Provan et al., 2001). Na základě toho se dají dělit na jaderné mikrosatelity (nuSSR), mitochondriální mikrosatelity (mtSSR) a chloroplastové mikrosatelity (cpSSR).

Chloroplastové SSR markery se odlišují od jaderných mikrosatelitů např. tím, že cpSSR jsou většinou relativně krátké (10–20 bp) úseky poly (A/T) repetice, a na rozdíl od jaderných mikrosatelitů jsou u nich poly (C/G) či dinukleotidové repetice vzácné (Weising et al., 2005). Další odlišností, oproti jaderným SSR, je pravděpodobně nižší výskyt mutací, což zjistili Provan et al. (1999) ve studii prováděné na velmi monomorfní populaci borovice Torreyovy (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). Zjištěná frekvence mutací byla mezi  $3,2 \times 10^{-5}$  a  $7,9 \times 10^{-5}$ . Tyto hodnoty jsou nižší než u jaderných SSR, ale vyšší než v jiných oblastech chloroplastového genomu. Weising et al. (2005) ale upozorňují, že se jedná pouze o hrubý odhad, jelikož v této studii nebylo použito dostatečně reprezentativní množství vzorků. Oproti jaderným SSR mají chloroplastové mikrosatelity nižší četnost rekombinací, což z nich dělá markery informačně hodnotné jak jednotlivě, tak i ve formě specifických cpDNA haplotypů (Weising et al., 2005).

Chloroplastové mikrosatelitní markery jsou díky svým vlastnostem, jako je haploidní povaha, nerekombinantnost a uniparentální dědičnost, využitelné hlavně pro populační, genetické a fylogeografické studie (Birky, 2001; Provan et al., 2001).

Např. Segarra-Moragues et al. (2007) využili uniparentální dědičnost cpSSR ke zjišťování předků z mateřské linie nového poddruhu pcháče *Cirsium vivanti*.

Ke studiu diverzity vyvinuli Provan et al. (2004) na základě chloroplastového genomu rýže, kukuřice a obilí univerzální primery pro celou čeleď lipnicovitých (*Poaceae*), která představuje velmi významnou skupinu plodin.

Gilmore et al. (2007) využili cpSSR k hodnocení diverzity a geografického původu konopí (*Cannabis sativa* L.). Haplotypy objevené v rámci této studie by mohly sloužit k identifikaci různých druhů konopí (*Cannabis sativa* L.), zejména k rozlišení odrůd s vysokým obsahem halucinogenních látek, zneužívaných k produkci drog.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Rostlinný materiál

Pro výzkum v rámci diplomové práce bylo celkem použito 225 vzorků chmele. Z toho bylo 8 vzorků izolováno ve 3 opakováních (zástupci všech tří bioregionů chmele – 3x Kavkaz, 3x Evropa a 2x USA) a používáno jako pracovní vzorky během optimalizace. Z celkových 225 vzorků chmele bylo 44 vyřazeno během analýzy, jelikož nebyl získán amplikon v některém ze studovaných lokusů. Podrobnější přehled použitých kultivarů je uveden v příloze 1. Jako pozitivní kontrola byl v některých částech práce použit vzorek DNA izolovaný z bramboru (*Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*), protože testované cpSSR markery byly pro chmel přejaty právě od brambor (Bryan et al., 1999).

### 4.2 Izolace DNA

Izolace rostlinného materiálu byla provedena pomocí kitu DNeasy Plant MiniKit (Qiagen) dle manuálu výrobce.

Postup izolace DNA z listů chmele:

- 1) Přibližně 100 mg rostlinného materiálu bylo naváženo do zkumavek, zmraženo v tekutém dusíku a následně rozmělněno skleněnou tyčinkou.
- 2) Do každé zkumavky bylo přidáno 400  $\mu$ l pufru AP1 a poté 4  $\mu$ l RNase A.
- 3) Vzorky byly homogenizovány na vibrační třepačce a uloženy na 10 minut do termobloku při teplotě 65 °C. Během těchto 10 minut byly vzorky průběžně znovu 2x až 3x homogenizovány na vibrační třepačce.
- 4) Poté bylo do zkumavek přidáno 130  $\mu$ l pufru AP2 a 20  $\mu$ l 25% roztoku PVP (polyvinylpyrrolidon).
- 5) Dále byly vzorky vloženy na 5 minut do mrazničky.
- 6) Vzorky byly centrifugovány při 13 000 x g po dobu 5 minut a poté byl supernatant přemístěn do fialových zkumavek s filtrem, které byly součástí kitu.
- 7) Následovala centrifugace při 13 000 x g po dobu 2 minut. Filtrát byl přemístěn do běžných zkumavek.
- 8) Byl přidán 1,5násobek objemu (675  $\mu$ l) AP3 pufru s etanolem.
- 9) Vzorky byly přepipetovány do bílých zkumavek s filtrem, které byly součástí kitu, a centrifugovány 1 minutu při 8 000 x g.
- 10) Filtry byly přemístěny do nových zkumavek.

- 11) Následně bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  AW pufru s etanolem a byla provedena centrifugace 1 minutu při 8 000 x g.
- 12) Po slití filtrátu do sběrné kádinky byl krok č. 11 zopakován.
- 13) Po opětovném slití filtrátu byla provedena centrifugace na sucho po dobu 2 minut při 13 000 x g.
- 14) Filtry byly přemístěny do čistých zkumavek a bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  AE pufru předem přehřátého na teplotu 65 °C.
- 15) Takto připravené vzorky byly inkubovány po dobu 5 minut v centrifuze a poté centrifugovány 1 minutu na 8 000 x g.
- 16) Do zkumavek bylo přidáno dalších 100  $\mu\text{l}$  přehřátého AE pufru, následovala inkubace a centrifugace shodná s krokem č. 15.
- 17) Izolovaná DNA byla umístěna v uzavřených zkumavkách do mrazničky.

#### 4.3 Kvalitativní a kvantitativní hodnocení DNA

U všech vzorků byla měřena koncentrace pomocí mikroobjemového UV spektrofotometru S-111107 NanoPhotometer (Implen) a také bylo provedeno stanovení přítomnosti kontaminujících látek. Všechny vzorky byly poté naředěny na výslednou koncentraci 10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

#### 4.4 Agarózová elektroforéza

Elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů probíhala na deskové horizontální agarózové elektroforéze (Bio-Rad) v 1,5% agarózovém gelu při napětí 120 V. K orientačnímu stanovení velikosti získaných fragmentů byl použit hmotnostní standard GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.5 Kapilární elektroforéza

Separace probíhala v genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 (Life Technologies) za podmínek nastavených v modulu GS STR POP4 (1 ml) G5, které jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tab. 1** Kapilární elektroforéza – podmínky separace

<b>Napětí při nástřiku [kV]</b>	10
<b>Doba nástřiku [sec]</b>	5
<b>Napětí při separaci [kV]</b>	15
<b>Doba separace [min]</b>	28
<b>Teplota separace [°C]</b>	60

#### 4.6 Bioinformatická analýza

V prvním kroku byla provedena bioinformatická analýza, kdy byly za pomoci chloroplastové databáze Chloroplast DB (Cui et al., 2006) staženy sekvence kompletních chloroplastových genomů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) (ID: Z00044.2) a bramboru (*Solanum tuberosum* L.) (ID: DQ386163.2). Z databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) byl stažen chloroplastový genom konopí (*Cannabis sativa* L.) (ID: KP274871.1) a v programu BLASTN ver. 2.2.31+ (Zhang et al., 2000) byl proveden alignment sekvencí mezi tabákem a konopím.

#### 4.7 Empirické ověření funkčnosti jednotlivých cpSSR markerů

Všechny dostupné markery byly testovány v singleplexovém uspořádání. Testování bylo provedeno v termocykleru T – gradient (Biometra). Reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 30 ng DNA, 0,25 U polymerázy Phusion Hot Start II (Thermo Fisher Scientific), 1x Phusion HF Buffer (Thermo Fisher Scientific), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP a 0,4 µM primerů (F, R). Podmínky amplifikace uvádí tabulka 2.

**Tab. 2** Teplotní profil PCR testování jednotlivých cpSSR

Proces	Počet cyklů	Teplota	Čas
<b>Předdenaturace</b>	1	98 °C	30 s
<b>Denaturace</b>	30	98 °C	10 s
<b>Anelace</b>	30	55 °C	20 s
<b>Elongace</b>	30	72 °C	20 s
<b>Finální elongace</b>	1	72 °C	600 s

Pro některé lokusy byly pomocí programu Primer 3 (Untergasser et al., 2012) a Reverse complement (Meskauskas, 2013) nově navrženy specifické primery R, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 3.



**Tab. 3** Sekvence nově navržených primerů R

Lokus	Marker	Primer	Sekvence primeru (5'–3')
<i>rps2</i> /RF862 intergenová oblast	NTCP 12	NTCP 12 R	AAATGAACGGCTTGGATCG
<i>psbC/trnS</i> intergenová oblast	NTCP 18	NTCP 18 R	TGGCTCGGCTATTCCACTTA
<i>psaI</i> /ORF184 intergenová oblast	NTCP 26	NTCP 26 R	TGCGTGAATACGAGCTTCTG
<i>clpP</i> intron	NTCP 29	NTCP 29 R	GCTCTTTTATTACAAATTCGACAGG
<i>clpP</i> intron	NTCP 30	NTCP 30a R	GAGACCCATTTTCAGCGTCAC
<i>clpP</i> intron	NTCP 30	NTCP 30b R	ATCAGGAGACCCATTTTCAGC
<i>rpoA</i> exon	NTCP 33	NTCP 33 R	CCCCTTTTTGATTTTCATGG
<i>rp12/trnH</i> intergenová oblast	NTCP 40	NTCP 40 R	GTGGATCAAGGCAGTGGATT

#### 4.8 Vývoj nového markeru pro lokus NTCP 8

Během testování jednotlivých cpSSR bylo zjištěno, že NTCP 8 amplifikuje v porovnání s ostatními velmi slabě. Na základě bioinformatické analýzy se předpokládalo, že problém je s vysokou pravděpodobností v místě nasedání primeru NTCP 8 F. Pro ověření, zda je problém v nasedání u primeru F či R, byly provedeny 2 rozdílné amplifikace, které využívaly skutečnosti, že amplifikovaly také markery NTCP 7 a NTCP 9, vyskytující se v relativní blízkosti lokusu NTCP 8 (1 196 a 75 bp mezi lokusy). V prvním případě byly do PCR reakční směsi použity primery NTCP 7 F a NTCP 8 R, předpokládaná velikost vzniklého fragmentu byla 1 670 bp. Druhá reakce obsahovala primer NTCP 8 F a NTCP 9 R, čímž měl teoreticky vzniknout fragment o velikosti 540 bp. V souladu s předpokladem amplifikoval pouze fragment dlouhý 1 670 bp.

##### 4.8.1 Podmínky amplifikace lokusu NTCP 8 určeného k sekvenaci

Reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng DNA, 0,5 U polymerázy Immolase (Bioline), 1x ImmoBuffer (Bioline), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP a 0,4 µM primerů (NTCP 7 F, NTCP 8 R). Amplifikace probíhala v termocykleru T – gradient (Biometra) a její podmínky jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tab. 4** Teplotní profil PCR pro amplifikaci na sekvenaci

Proces	Počet cyklů	Teplota	Čas
Předdenaturace	1	95 °C	600 s
Denaturace	35	95 °C	20 s
Anelace	35	50 °C	40 s
Elongace	35	72 °C	120 s
Finální elongace	1	72 °C	600 s

Separace amplifikovaných fragmentů byla provedena v 1,5% agarózovém gelu při napětí 120 V po dobu 1 hodiny. K ověření správné velikosti byl použit hmotnostní standard GeneRuler 100 bp (Thermo Fisher Scientific). Vzniklé fragmenty byly vyříznuty skalpelem a izolovány pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

#### 4.8.2 Sekvenační reakce

Reakční směs o objemu 20  $\mu$ l obsahovala 50 ng DNA, 1x sekvenační pufr (Life Technologies), 3,2  $\mu$ M F či R primer a 2  $\mu$ l sekvenační směsi BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies). Testování bylo provedeno v termocykleru C1000 (Bio-Rad). Podmínky sekvenační reakce uvádí tabulka 5.

**Tab. 5** Teplotní profil pro sekvenační reakci

Proces	Počet cyklů	Teplota	Čas
Předdenaturace	1	96 °C	60 s
Denaturace	25	96 °C	10 s
Anelace	25	50 °C	5 s
Elongace	25	60 °C	240 s
Finální elongace	1	60 °C	600 s

#### 4.8.3 Purifikace po sekvenační reakci

Postup purifikace:

- 1) Byly přidány a následně promíchány 2  $\mu$ l glykogenu (Thermo Fisher Scientific), 50  $\mu$ l 96% etanolu a 2  $\mu$ l 3M octanu sodného.
- 2) Následovalo ponechání vzorků po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.
- 3) Vzorky byly centrifugovány po dobu 30 minut při 13 000 x g.
- 4) Ze vzorků byl opatrně odpipetován roztok, bílá sraženina byla ve zkumavce ponechána a poté bylo přidáno 200  $\mu$ l 70% etanolu.
- 5) Vzorky byly centrifugovány po dobu 15 minut při 13 000 x g.

- 6) Poté byly zopakovány dva předchozí body.
- 7) Následně byly vzorky sušeny při teplotě 50 °C po dobu 20 minut.
- 8) Do každé zkumavky bylo přidáno 12 µl Hi-Di formamidu (Life Technologies).
- 9) Na závěr proběhla denaturace vzorků v termocykleru C1000 (Bio-Rad) při teplotě 95 °C po dobu 5 minut.

#### 4.8.4 Sekvenace

Vlastní sekvenace byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 (Life Technologies). Separace probíhala v kapiláře dlouhé 47 cm s polymerem POP4 v 1x Running pufru (Life Technologies). V Data Collection Software 3.1.0 byl nastaven KB\_310\_POP4\_BDTv3\_36Std Dye Set a jako základní modul byl zvolen Seq POP4 (1 ml)E. Doba nástřiku byla 30 s při napětí 1 kV. Separace probíhala při 11,3 kV a teplotě 50 °C po dobu 35 minut.

#### 4.8.5 Vývoj a optimalizace nového primeru pro lokus NTCP 8

Na základě výsledků sekvenace chmele (viz kapitola 5.2) byly pomocí programu Primer 3 (Untergasser et al., 2012) navrženy tři nové primery NTCP 8 Fa, NTCP 8 Fb, NTCP 8 Fc, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tab. 6** Sekvence nově navržených primerů F pro NTCP 8

Lokus	Marker	Primer	Sekvence primeru (5'–3')
<i>trnG</i> intron	NTCP 8	NTCP 8 Fa	TGTTAGAATCCCCTTCTTTTC
<i>trnG</i> intron	NTCP 8	NTCP 8 Fb	GACTTTGGTTTACTAGAGACATC
<i>trnG</i> intron	NTCP 8	NTCP 8 Fc	TTGGTTTACTAGAGACATCGACT

Tyto primery byly testovány za stejných podmínek PCR jako v tabulce 2, s tím rozdílem, že počet cyklů byl zvýšen na 35, anelace byla prodloužena na 30 s a optimální  $T_a$  (aneláční teplota) byla stanovena pomocí teplotního gradientu v rozmezí od 53 °C do 57 °C. Jako nejvíce vyhovující  $T_a$  byla určena teplota 54 °C. Ze tří testovaných markerů bylo dosaženo nejkvalitnější amplifikace pomocí primeru NTCP 8 Fb, který byl dále optimalizován. Optimalizace spočívala v testování koncentrací jednotlivých komponent reakční směsi a přidavku různých aditiv, jako je BSA (bovinní sérum albuminu) či PCR Enhancer (Top-Bio). Celkem bylo otestováno 7 variant, přehledně shrnutých v tabulce 7, které probíhaly za teplotních podmínek PCR shodných s podmínkami uváděnými v tabulce 8.

**Tab. 7** Varianty testované při optimalizaci NTCP 8 Fb

	Var. 1	Var. 2	Var. 3	Var. 4	Var. 5	Var. 6	Var. 7
DNA	30 ng	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phusion Hot Start II polym.	0,15 U	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phusion HF Buffer	1x	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MgCl <sub>2</sub>	1,8 mM	1,5 mM	1,8 mM	2 mM	2,2 mM	2 mM	2,2 mM
dNTP	0,2 mM	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Primer F	0,4 μM	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Primer R	0,4 μM	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BSA	×	0,4 μg/μl	✓	✓	✓	✓	✓
PCR Enhancer	×	2 mM	✓	✓	✓	×	×

**Symboly:** × znamená, že tento komponent nebyl v dané variantě použit, ✓ znamená, že se koncentrace shoduje s var. 1 či v případě BSA a PCR Enhanceru s var. 2

#### 4.9 Multiplex PCR

Před samotnou tvorbou multiplexu bylo otestováno, zda je varianta 7, vybraná při optimalizaci NTCP 8, funkční i u ostatních markerů v singleplex uspořádání. Funkčnost byla otestována pomocí gelové elektroforézy (viz obrázek 15), i kapilární elektroforézy. Během tohoto testování byl z důvodu nekvalitní amplifikace vyřazen marker NTCP 23. Byly vytvořeny dva multiplexy, značené M1 a M2.

##### 4.9.1 Multiplex M1

Z NTCP markerů funkčních v první fázi testování (viz kapitola 5.1), byl pomocí programů AutoDimer (Vallone et Butler, 2004) a Multiplex Manager 1.0 (Holleley et Geerts, 2009) složen multiplex M1. Během testování multiplexu M1 byly optimalizovány koncentrace jednotlivých primerů za účelem získání vyrovnaného signálu. Výsledkem byl tzv. hexaplex se složením reakce odpovídajícím variantě 7 lišící se pouze koncentrací jednotlivých primerů, které byly následující: 0,2 μM (NTCP 3, 7), 0,05 μM (NTCP 8, 37), 0,4 μM (NTCP 9), 0,3 μM (NTCP 28). Teplotní profil PCR pro výsledný multiplex M1 je uveden v tabulce 8.

#### 4.9.2 Multiplex M2

Z NTCP markerů, pro které byly vyvinuty nové specifické primery R (viz tabulka 3), byl pomocí programů AutoDimer (Vallone et Butler, 2004) a Multiplex Manager 1.0 (Holleley et Geerts, 2009) složen multiplex M2. Optimalizace multiplexu M2 byla prováděna obdobným způsobem jako v případě multiplexu M1. Výsledkem byl tzv. tetraplex se složením reakce odpovídajícím variantě 7 lišící se koncentrací jednotlivých primerů, které byly následující: 0,24  $\mu\text{M}$  (NTCP 33) a 0,28  $\mu\text{M}$  (NTCP 12, 26, 30a). Teplotní profil PCR pro výsledný multiplex M2 je uveden v tabulce 8.

**Tab. 8** Teplotní profil PCR pro výsledné multiplexy M1 a M2

Proces	Počet cyklů	Teplota	Čas
Předdenaturace	1	98 °C	30 s
Denaturace	30	98 °C	10 s
Anelace	30	53 °C	20 s
Elongace	30	72 °C	20 s
Finální elongace	1	72 °C	600 s

#### 4.10 Statistická analýza

Intra i interpopulační analýza, která zahrnovala určení počtu a frekvence alel, počet a frekvenci haplotypů, počet privátních haplotypů, genetickou diverzitu ( $H_s$ ) a fixační index ( $F_{st}$ ) byla provedena v programu HaplotypeAnalysis ver. 1.05 (Eliades et Eliades, 2009). Shluková analýza byla provedena v programu STATISTICA ver. 12 (Statsoft).

## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky bioinformatické analýzy

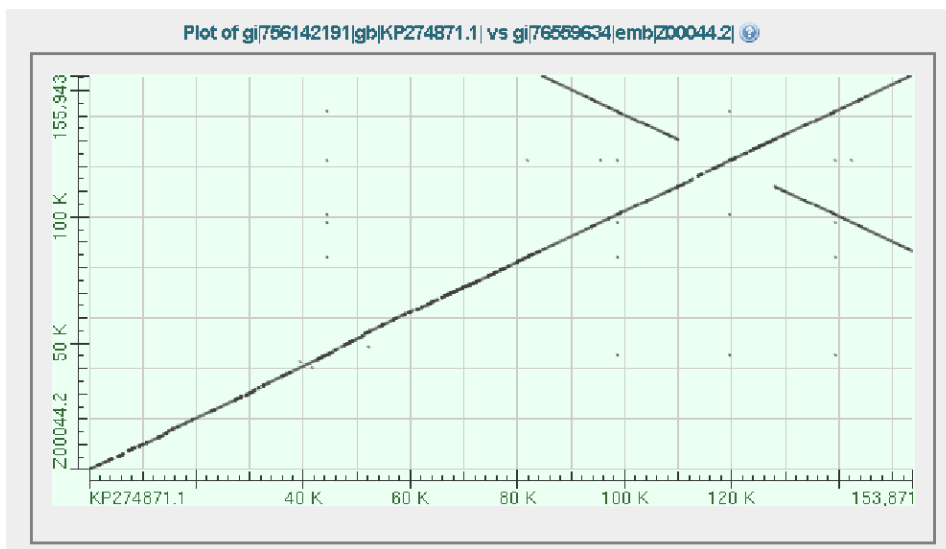
Z celkem 23 zkoumaných cpSSR markerů bylo možné sekvenčně porovnat 20 lokusů mezi konopím a tabákem. Zbylé 3 lokusy nebyly v chloroplastu konopí nalezeny. Tvorba nových markerů byla provedena ve dvou fázích. V první fázi byly testovány všechny dostupné markery z hlediska amplifikace v singleplex uspořádání. Tyto amplifikující markery se pak staly základem pro vytvoření multiplexu M1. Ve druhé fázi byly vyhledány lokusy, které vykazovaly vysokou sekvenční podobnost v místě nasedání F primerů. Kritériem pro výběr byl výskyt maximálně 2 bodových mutací. Výsledek analýzy z hlediska počtu bodových mutací jak pro F, tak pro R primery uvádí tabulka 9. Pro tyto lokusy byly navrženy nové R primery (viz tabulka 3). Dané lokusy se staly základem pro tvorbu multiplexu M2.

**Tab. 9** Počty bodových mutací u primerů F a R na základě alignmentu tabáku a konopí

Marker	Počet mutací – primer F	Počet mutací – primer R
NTCP3	1	2
NTCP4	–	–
NTCP6	–	0
NTCP7	2	0
NTCP8	3	0
NTCP9	0	0
NTCP10	0	4
NTCP12	1	8
NTCP14	–	–
NTCP18	2	2
NTCP19	1	1
NTCP20	13	1
NTCP23	10	0
NTCP24	6	6
NTCP26	1	8
NTCP27	5	9
NTCP28	1	1
NTCP29	2	7
NTCP30	1	11
NTCP33	1	5
NTCP37	0	1
NTCP39	2	0
NTCP40	0	0

**Symboly:** – značí, že údaje pro tento primer nejsou dostupné

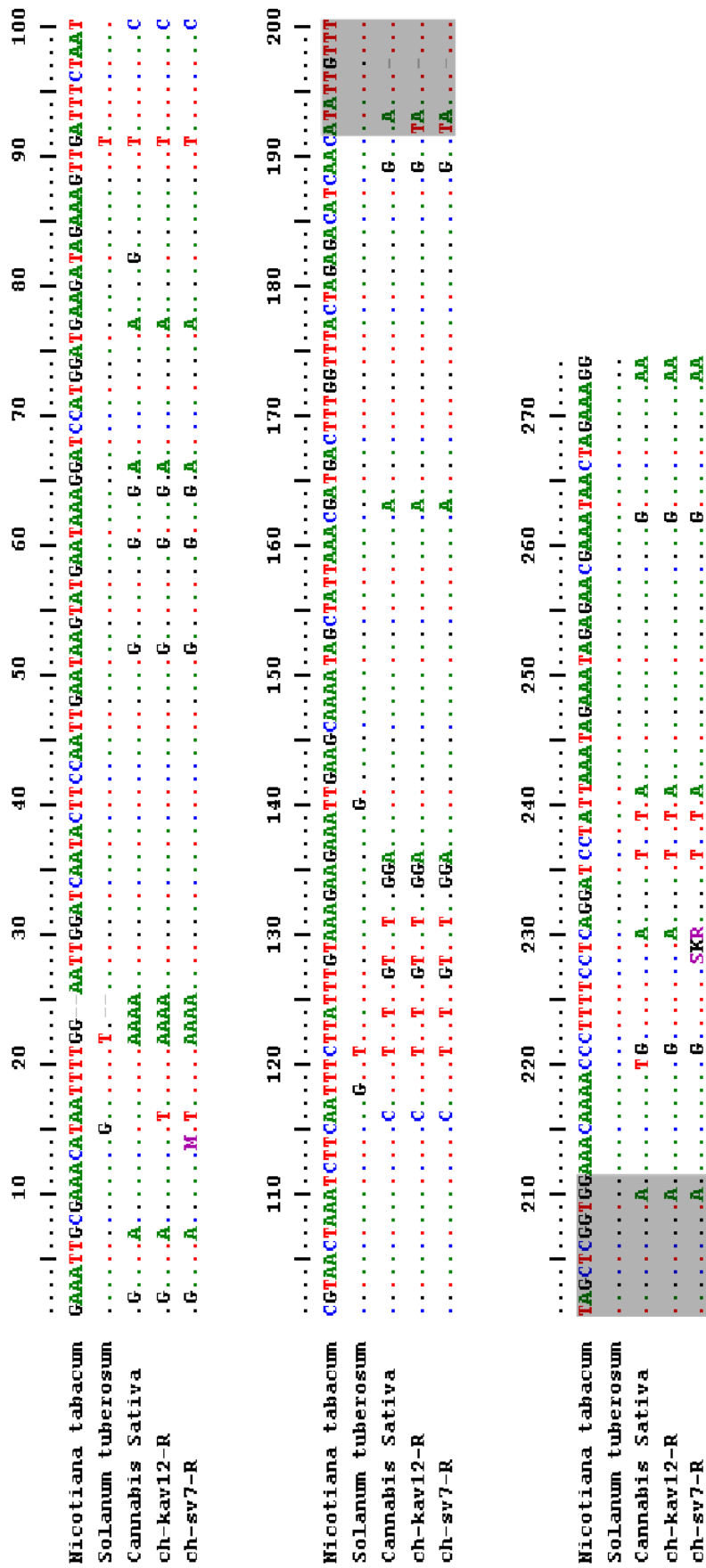
Při porovnání kompletních chloroplastových sekvencí bylo také zjištěno, že lokus NTCP 40 se vyskytuje v genomu konopí (*Cannabis sativa* L.) ve dvou kopiích, které jsou vůči sobě invertované. Důvodem je výskyt v jedné ze dvou oblastí označovaných jako IR (inverted repeat), které oddělují LSC a SSC oblasti. Tyto oblasti mají velikost přibližně 25 Kb, jak ukazuje bodový graf (obr. 10) vytvořený na základě alignmentu chloroplastomu tabáku a konopí.



**Obr. 10** Bodový graf alignmentu chloroplastomu tabáku (Z00044.2) – osa y a konopí (KP274871.1) – osa x

## 5.2 Výsledky sekvenace lokusu pro marker NTCP 8

Získané sekvence chmele byly v programu BioEdit ver. 7.0.9.0 (Hall, 1999) porovnány se sekvencemi tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a konopí (*Cannabis sativa* L.) – viz obrázek 11. V místě nasedání původního primeru NTCP 8 F (na obrázku 11 vyznačeno šedě) bylo nalezeno několik bodových mutací znemožňujících amplifikaci daného lokusu. Jak je patrné z obrázku 11, byly u chmele detekovány celkem 3 substituce a 1 delece. Na 1. nukleotidu ve směru 5' → 3' byla u chmele nalezena transverze (T>A), na 2. pozici transverze (A>T), na 6. pozici jednonukleotidová delece a na 19. pozici tranzice (A>G).

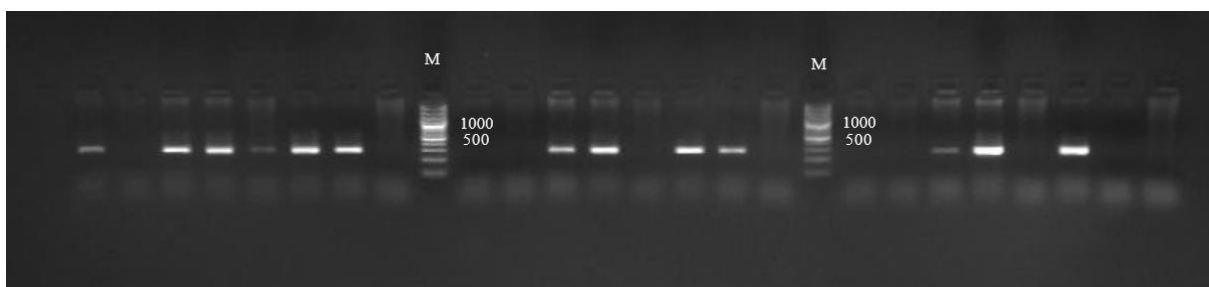


Obr. 11 Alignment sekvenci pro marker NTCP 8, šedé – oblast původního primeru NTCP 8 F

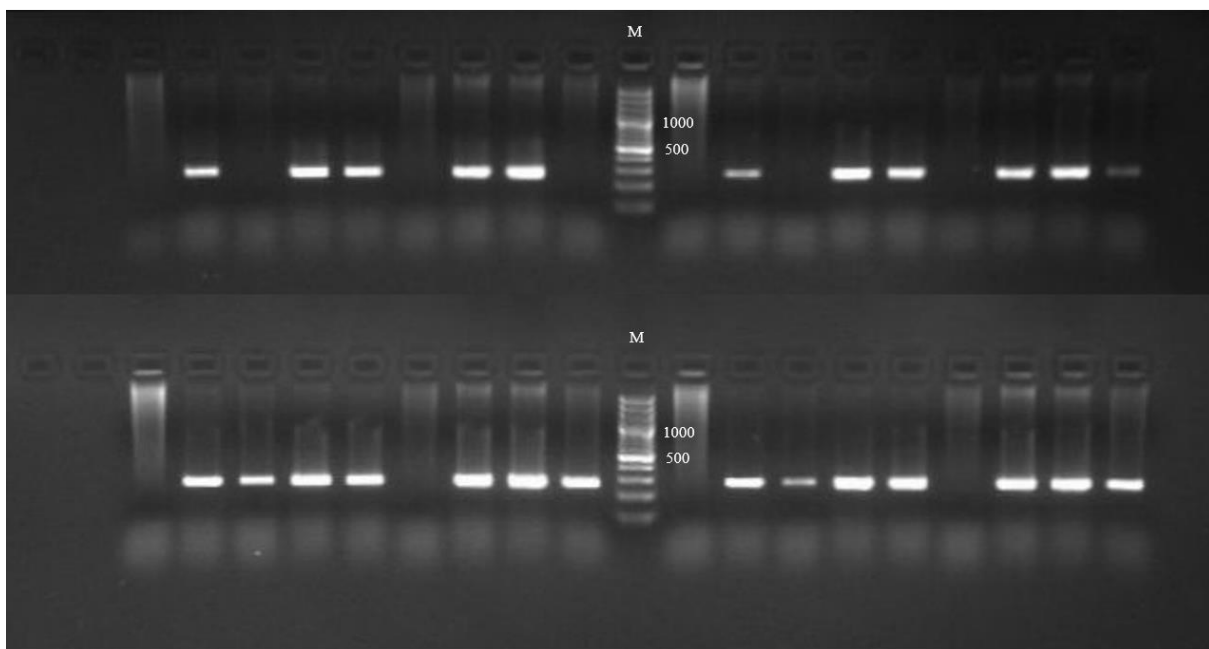


### 5.3 Výsledky optimalizace a tvorby multiplexů

V průběhu optimalizace bylo testováno 7 variant (viz tabulka 7), přičemž jednotlivé testované varianty jsou prezentovány na obrázcích 12 a 13. Jako nejlepší byla vyhodnocena varianta 7, která obsahovala nejvyšší množství hořčíku – 2,2 mM a 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA. Jak je z obrázků 12–13, patrné u některých genotypů, které jsou převážně amerického původu, nedocházelo k amplifikaci.

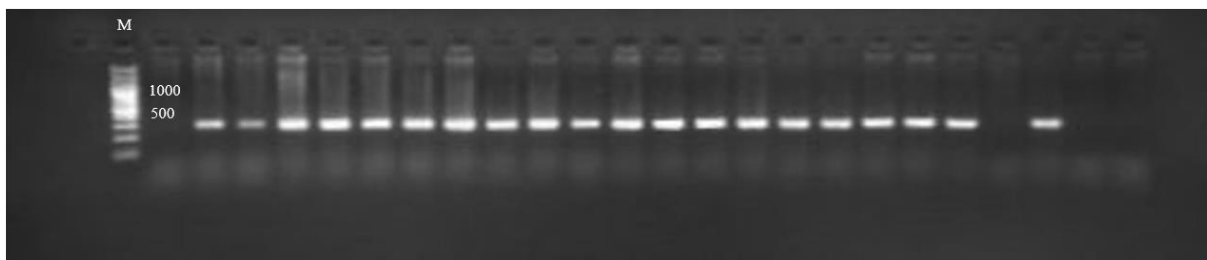


**Obr. 12** Optimalizace markeru NTCP 8 Fb, varianta 1–3 (zprava doleva), M = hmotnostní standard



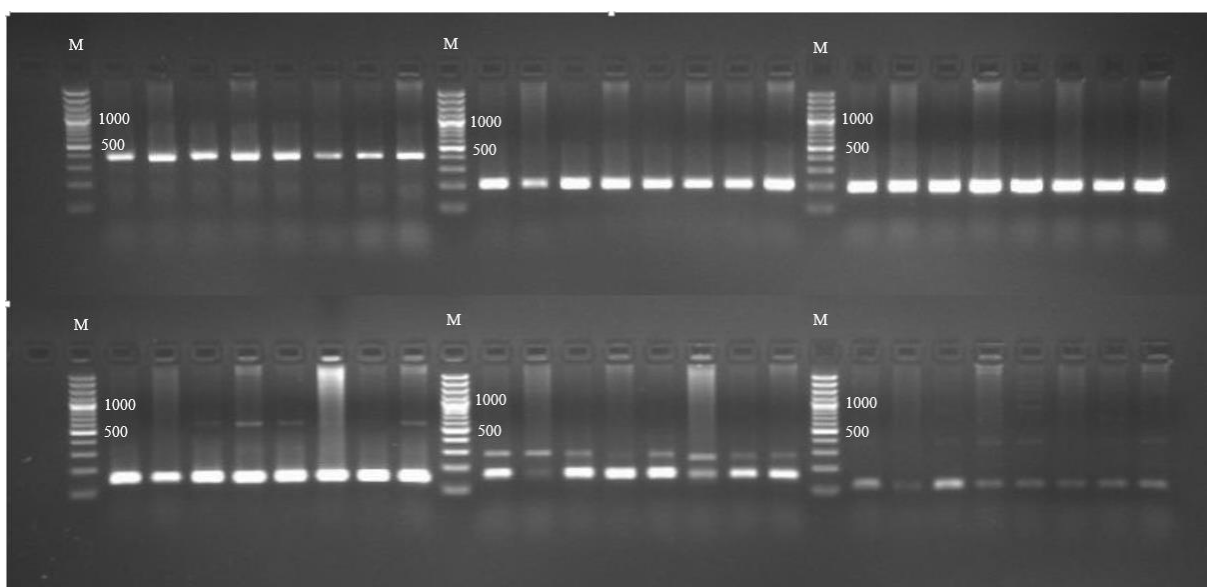
**Obr. 13** Optimalizace markeru NTCP 8 Fb, varianta 4–7 (zprava doleva a ze shora dolů), M = hmotnostní standard

Pro ověření funkčnosti varianty 7 bylo provedeno testování na 24 náhodných vzorcích chmele, přičemž jednotlivé bioregiony byly zastoupeny vždy po 8 vzorcích. Výsledek tohoto testování je zobrazen na obrázku 14. Jako v předchozím případě nedochází k amplifikaci u některých genotypů (viz obr. 14).



**Obr. 14** Testování markeru NTCP 8 Fb, varianty 7 na 24 náhodných vzorcích chmele, M = hmotnostní standard

Výsledné složení reakční směsi a teplotní profil PCR pro marker NTCP 8 bylo otestováno u zbývajících markerů jak v single, tak v multiplexovém uspořádání. Kvalitu amplifikace u jednotlivých markerů ukazuje elektroforeogram na obrázku 15.

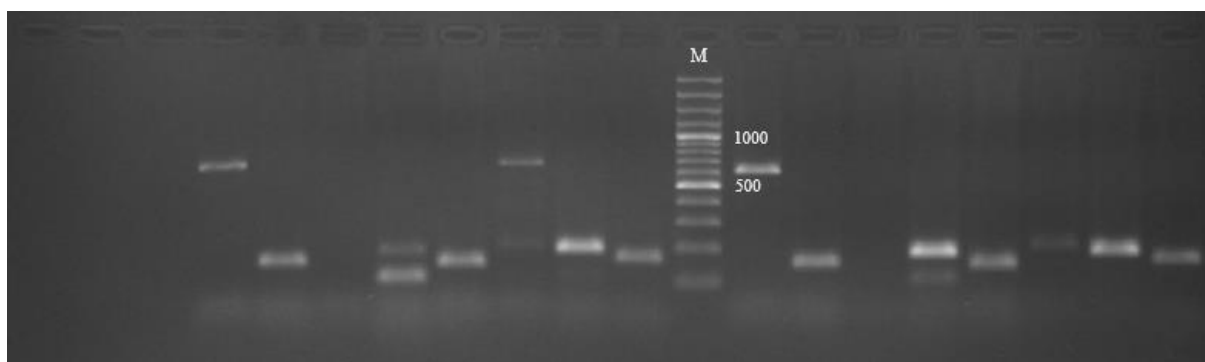


**Obr. 15** Testování varianty 7 u markerů NTCP 3, NTCP 7, NTCP 9 (horní část obrázku, zprava doleva), NTCP 23, NTCP 28, NTCP 37 (spodní část obrázku, zprava doleva) v singleplex uspořádání, M = hmotnostní standard

Z původních 23 cpSSR markerů navržených Bryan et al. (1999) pro rod *Solanum*, bylo u chmele funkčních 8 markerů, a to konkrétně cpSSR pod označením NTCP 3, NTCP 7, NTCP 8, NTCP 9, NTCP 19, NTCP 23, NTCP 28, NTCP 37. Během optimalizace a testování došlo k vyřazení NTCP 19 a NTCP 23. Důvodem pro vyřazení NTCP 19 byla tvorba nesespecifického produktu ve velikosti jiného testovaného mikrosatelitního markeru, což bránilo jeho jednoznačné identifikaci. Marker NTCP 23 byl vyřazen z důvodu nekvalitní amplifikace (obr. 15 vpravo dole). Pro marker NTCP 8 byl nově vytvořen F primer (viz kapitola 4.8.5). Z těchto šesti markerů byl nakonec vytvořen multiplex M1.

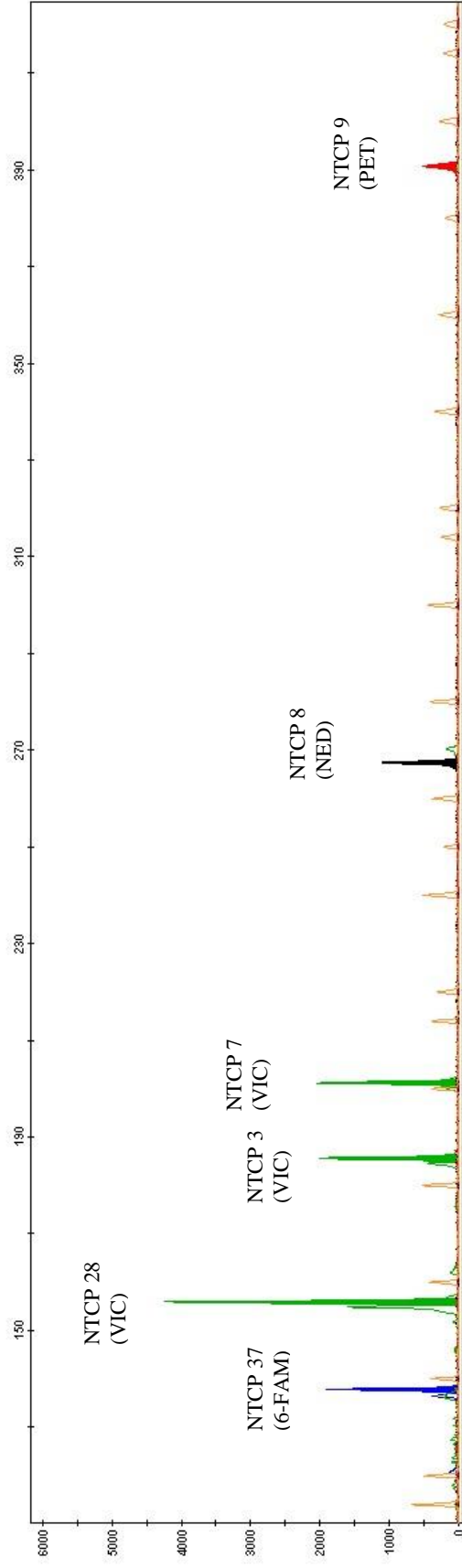
V případě druhého multiplexu M2 bylo potřeba pomocí programu Primer 3 (Untergasser et al., 2012) navrhnout nové specifické primery R, jejichž sekvence jsou

uvedeny v tabulce 3. Celkem bylo navrženo 8 R primerů pro lokusy NTCP 12, NTCP 18, NTCP 26, NTCP 29, NTCP 30, NTCP 33, NTCP 40. Z těchto 8 primerů byly, s výjimkou NTCP29, všechny funkční. Primery NTCP 30a R a 30b R byly funkční oba, ale do výsledného multiplexu byl vybrán pouze NTCP 30a R, který poskytoval lepší profil. Funkčním markerem byl i NTCP 40, který vykázal velikostní polymorfismus mezi testovanými vzorky. Vzhledem k velikosti amplikonu (>600 bp; obr. 16) není NTCP 40 v současné podobě vhodný pro markerování, a proto nebyl zařazen do žádného z multiplexů.

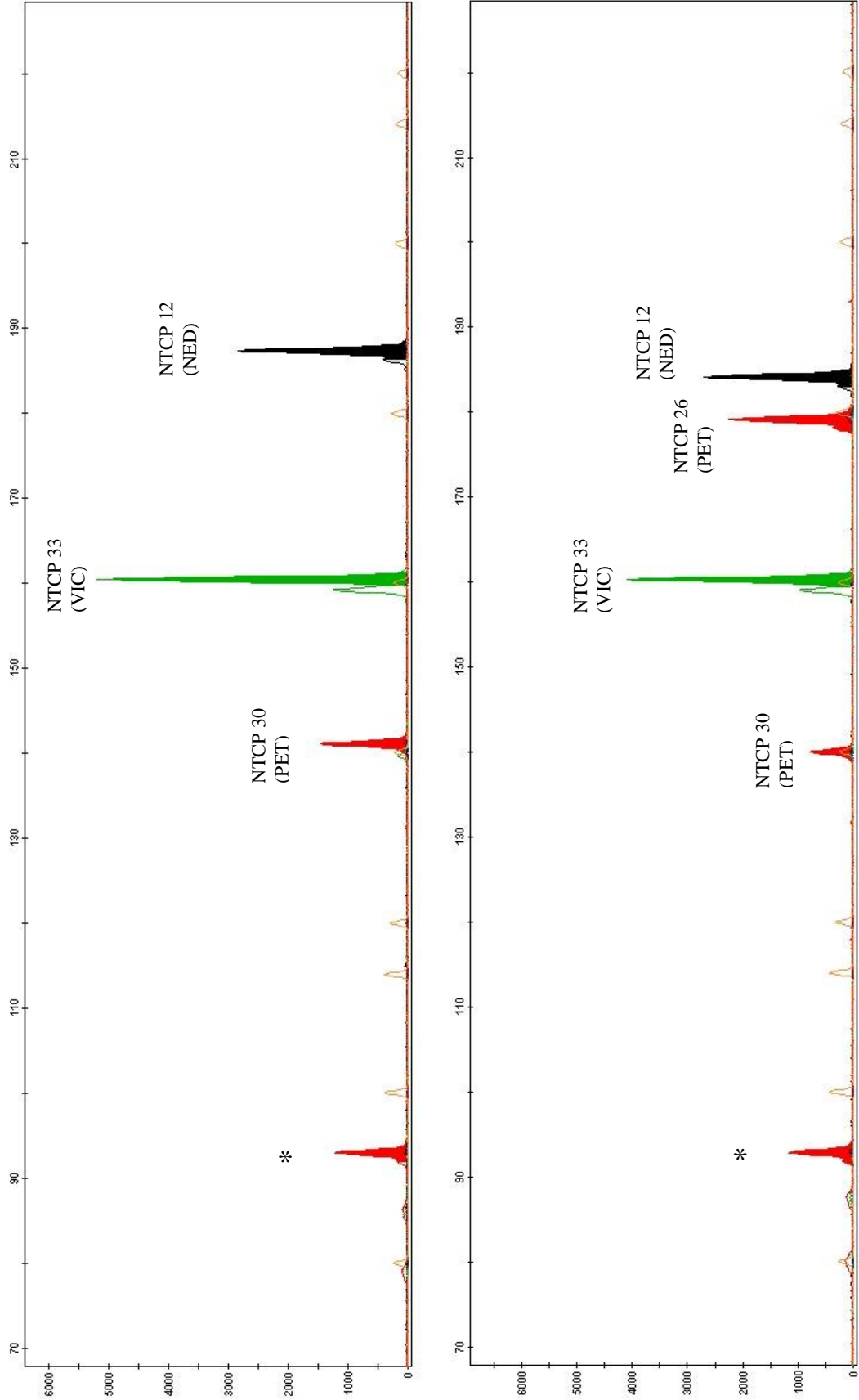


**Obr. 16** Testování všech nově navržených markerů NTCP 33, NTCP 12, NTCP 18, NTCP 30, NTCP 26, NTCP 29, NTCP 30b, NTCP 40 (zprava doleva), M = hmotnostní standard

Pro ilustraci výsledné podoby multiplexů M1 a M2 po separaci v kapilární elektroforéze jsou uvedeny jejich elektroforeogramy na obrázcích 17 a 18. Jak je patrné z obrázku 18, u markeru NTCP 26 vzniká nespecifický produkt (na obrázku označen \*), což bylo potvrzeno i v singleplexovém uspořádání. Na obrázku 18 lze dále vidět rozdíly u různých genotypů pro marker NTCP 26, kde dochází, ve většině případů, k amplifikaci pouze u chmelů původem z amerického bioregionu.



**Obr. 17** Výsledný multiplex M1



**Obr. 18** Výsledné multiplexy M2 u kultivaru – kult 40 a amerického genotypu chmele – USA 51 (ze shora dolů), \* = nespecifický produkt markeru NTCP 26

## 5.4 Výsledky statistické analýzy

### 5.4.1 Deskriptivní statistika

Celkem bylo získáno 10 markerů, z nichž 6 bylo polymorfních. V každém z těchto polymorfních lokusů byly nalezeny dvě, popř. tři alely, jejichž velikosti (bp) jsou uvedeny v závorce pro jednotlivé lokusy: NTCP 7 (201, 202), NTCP 9 (391, 407), NTCP 12 (184, 187), NTCP 26 (72, 179), NTCP 28 (156, 157), NTCP 30 (139, 140, 141). Zbylé čtyři lokusy NTCP 3 (186), NTCP 8 (267), NTCP 33 (160) a NTCP 37 (138) byly monomorfní.

K posouzení variability bylo provedeno porovnání na několika úrovních. Nejprve byla analyzována variabilita všech chmelů tvořících kolekci genobanky Chmelařského institutu s. r. o. Dále byly chmely rozděleny a porovnány v rámci skupin planých a kulturních chmelů. Na poslední úrovni byly chmely tříděny podle předpokládaných bioregionů.

#### 5.4.1.1 Celková variabilita

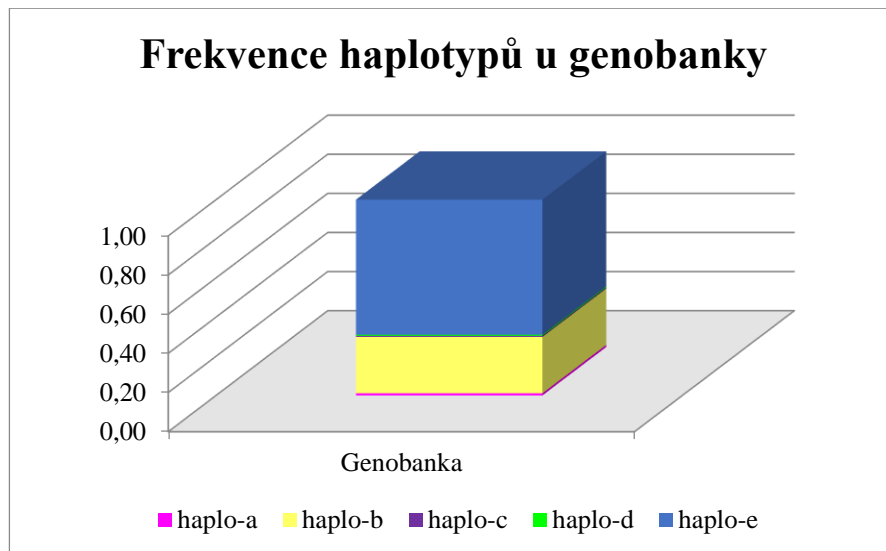
Celkem bylo nalezeno 5 haplotypů (a–e), viz tabulka 10, přičemž haplotyp b a e představují majoritní podíl (> 95 %) pro jakoukoliv skupinu chmelů, ať už při srovnání plané vs. kulturní, nebo v rámci jednotlivých bioregionů u planých chmelů. U chmelů původem z Evropy se vyskytoval pouze haplotyp e. Také u chmelů z Kavkazu byl tento haplotyp převládající, vyskytoval se u 96 % vzorků, přičemž zbývající 4 % připadala na haplotyp b. Pro chmely původem z Ameriky byl typický zejména haplotyp b (89 %). Frekvence jednotlivých haplotypů jsou uvedeny v tabulce 11 a znázorněny v grafu na obrázku 19.

**Tab. 10** Haplotypy a–e

Haplotyp	
haplo-a	186 201 267 391 156 138 184 179 139 160
haplo-b	186 201 267 391 156 138 184 179 140 160
haplo-c	186 202 267 407 156 138 187 72 141 160
haplo-d	186 202 267 407 157 138 187 179 141 160
haplo-e	186 202 267 407 157 138 187 72 141 160

**Tab. 11** Frekvence haplotypů u porovnávaných skupin

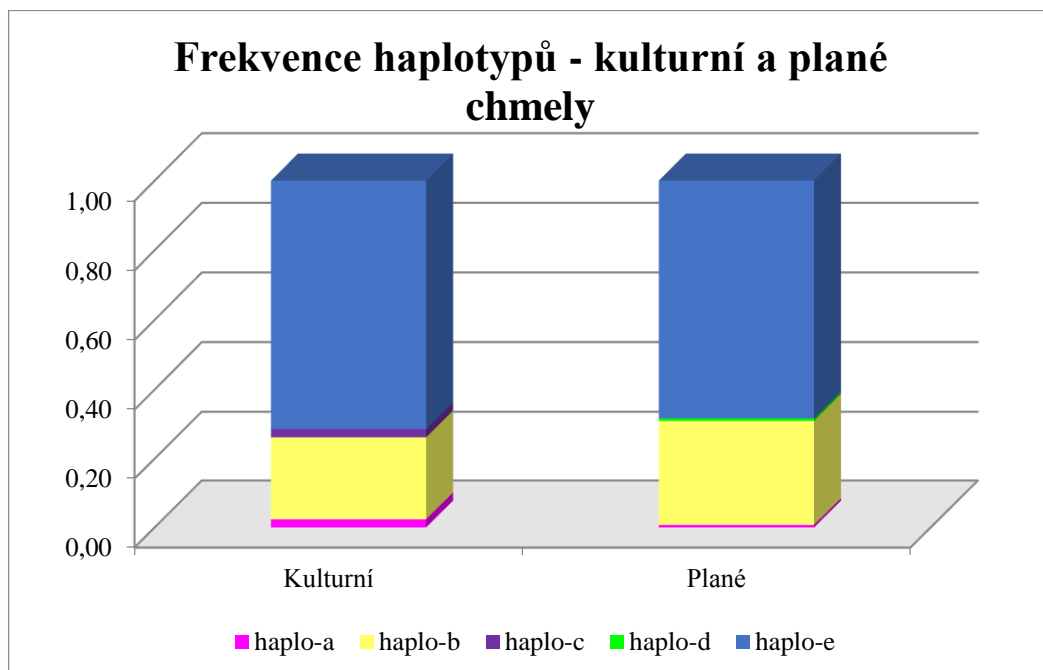
Haplotyp	Genobanka	Kulturní	Plané	Evropa	Amerika	Kavkaz
haplo-a	0,01	0,02	0,01	0,00	0,02	0,00
haplo-b	0,29	0,24	0,30	0,00	0,89	0,04
haplo-c	0,01	0,02	0,00	–	–	–
haplo-d	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00
haplo-e	0,69	0,71	0,68	1,00	0,07	0,96



**Obr. 19** Frekvence haplotypů u genobanky

#### 5.4.1.2 Variabilita mezi kulturními a planými chmelý

Při porovnání kulturních a planých chmelů bylo nalezeno celkem 5 haplotypů, z toho 2 haplotypy byly privátní. Haplotyp a se vyskytoval u obou skupin stejně, haplotyp b se vyskytoval více u planých chmelů (z 81 %), haplotyp c byl privátní pro kultivary, haplotyp d byl privátní pro plané chmelý a haplotyp e se vyskytoval více u planých chmelů (ze 76 %). Frekvence jednotlivých haplotypů ilustruje graf na obrázku 20 a výsledky intrapopulační a interpopulační analýzy jsou zobrazeny v tabulce 13.



**Obr. 20** Frekvence haplotypů planých a kulturních chmelů

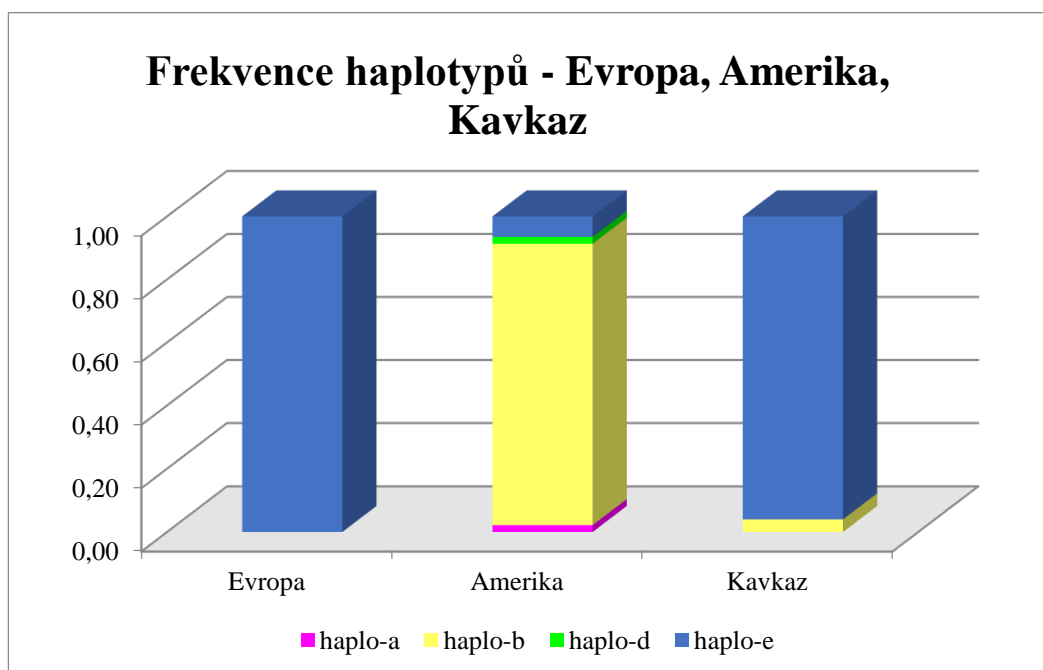
**Tab. 12** Intra a interpopulační analýza planých a kulturních chmelů

Populace	Počet vzorků	Počet haplotypů	Počet privátních haplotypů	H <sub>s</sub>	F <sub>st</sub>
Kultivary	42	4	1	0,100	0,005
Plané	139	4	1	0,339	0,002

Poznámka: H<sub>s</sub>, F<sub>st</sub> – viz seznam zkratk

#### 5.4.1.3 Variabilita chmelů členěných podle bioregionů

Porovnáním planých chmelů původem z Ameriky, Evropy a Kavkazu byly nalezeny celkem 4 haplotypy. Haplotypy 1 a 3 byly privátní pro chmely původem z Ameriky. Haplotyp 2 se vyskytoval převážně u chmelů amerického původu, ale byl nalezen také u jednoho chmelu původem z Kavkazu (kav 108). Haplotyp 4 se vyskytoval u všech třech skupin, převládá u chmelů evropského původu (z cca 72 %) a byl nalezen jen u třech chmelů původem z Ameriky. Frekvence těchto haplotypů znázorňuje graf na obrázku 21. Výsledky intrapopulační analýzy jsou uvedeny v tabulce 14.



**Obr. 21** Frekvence haplotypů pro chmely původem z Evropy, Ameriky a Kavkazu

**Tab. 13** Intra a interpopulační analýza chmelů původem z Evropy, Ameriky a Kavkazu

Populace	Počet vzorků	Počet haplotypů	Počet privátních haplotypů	H <sub>s</sub>	F <sub>st</sub>
Evropské	68	1	0	0,000	1,000
Americké	46	4	2	0,066	0,731
Kavkazské	25	2	0	0,014	0,767

Poznámka: H<sub>s</sub>, F<sub>st</sub> – viz seznam zkratk



## 6 Diskuze

### 6.1 Bioinformatická analýza

Jak ukázaly výsledky této práce, kombinace bioinformatické analýzy sekvenčních dat spolu s laboratorním ověřením a testováním potenciálních markerů, původně navržených pro jiný rostlinný druh, umožňuje nové markery vyvinout poměrně rychle a efektivně. V rámci experimentální části práce bylo analyzováno 23 cpSSR vytvořených pro taxonomicky vzdálený tabák (*Nicotiana tabacum* L.), přičemž se 10 z nich podařilo využít pro studium diverzity u chmele. Z těchto 10 lokusů bylo 6 polymorfních, což znamená 60% úspěšnost. Z hlediska přenositelnosti polymorfních cpSSR markerů se v rámci čeledi jedná o standardní hodnotu, jak ukazují Ebert et Peakall (2009) ve svém souhrnném přehledu. V tomto přehledu kolísá úspěšnost od 17 do 100 %, s mediánovou hodnotou 66,7 %. V současné době, pokud je nám známo, existuje pouze jediná studie zabývající se tvorbou cpSSR markerů u chmele. V této studii Peredo et al. (2010) testovali 32 chloroplastových lokusů, přičemž amplifikovalo 29 (> 90 %) z nich, ale z tohoto počtu byly „pouze“ 3 polymorfní (~ 10 %). Vysvětlení tak rozdílné úspěšnosti může spočívat v odlišné strategii analýzy, odpovídající době, kdy byla tato studie provedena a kdy ještě nebyla dostupná kompletní sekvence chloroplastů příbuzných druhů alespoň na úrovni čeledi. Z tohoto důvodu využili Peredo et al. (2010), mezi jinými, sadu univerzálních chloroplastových primerů dle Weising et Gardner (1999), což vysvětluje vysokou úspěšnost z hlediska amplifikace. Nižší úspěšnost z hlediska polymorfismu pak může vysvětlovat fakt, že jsou tyto univerzální primery obvykle navrhovány do vysoce konzervativních oblastí chloroplastu a je pak otázkou náhody, je-li amplifikovaná oblast variabilní pro mikrosatelitní repetici (López-Vinyallonga et al., 2011). Dokladem kolísající úspěšnosti při využití univerzálních primerů (Vendramin et al., 1996; Weising et Gardner, 1999; Provan et al., 2004) je celá řada studií u různých taxonomických druhů. Například u hagenie habešské (*Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel) získali ze 7 amplifikujících markerů 3 polymorfní (~ 43 %), stejnou úspěšnost měl i výzkum Eliades et al. (2011) provedený u cedru krátkolistého – *Cedrus brevifolia* (Hook. f.) Henry. López-Vinyallonga et al. (2011) zjistili, že u rodu chrpa (*Centaurea*) byly z celkem 6 lokusů 3 lokusy polymorfní (50 %). Chacón et al. (2007) uvádí, že z 10 amplifikujících lokusů získali 70 % polymorfních markerů pro fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.). Ze 14 amplifikujících lokusů získali Cheng et al. (2005) pro rod *Citrus* ~ 79 % polymorfních markerů.

Lze předpokládat, že úspěšnost tvorby cpSSR markerů by mohla být ještě vyšší, pokud by tato diplomová práce měla jinou strategii získávání nových chloroplastových markerů. Volba daného postupu vycházela především z limitovaných finančních zdrojů a možností analýzy. Na Katedře genetiky a šlechtění ČZU v Praze bylo díky grantovému projektu dostupných pro rod *Solanum* 36 cpSSR markerů, designovaných pro analýzu pomocí kapilární elektroforézy a tudíž fluorescenčně značených. Z těchto 36 markerů, původně navržených pro studium variability u tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), bylo u rodu *Solanum* 23 polymorfních a tyto se pak staly základem pro tvorbu nových markerů u chmele.

Nejvhodnějším postupem pro tvorbu chloroplastových markerů je v dnešní době provádění *de novo* sekvenací nekódujících oblastí chloroplastomu (Ebert et Peakall, 2009). Díky NGS (Next Generation Sequencing) technologiím (Mardis, 2008; Schadt et al., 2010) v kombinaci s dalšími postupy (Jansen et al., 2005) se tento způsob může v blízké budoucnosti stát rutinní záležitostí, k čemuž přispívá i malá velikost chloroplastového genomu, jak ukazují např. Cronn et al. (2008), Tangphatsornruang et al. (2010) nebo Yang et al. (2010). Nicméně i vhodná kombinace bioinformatické analýzy spolu s ověřováním v laboratoři může vést k požadovanému cíli, jak ostatně dokazují výsledky této práce.

## 6.2 Optimalizace cpSSR markerů

Neméně důležitým krokem pro získání úspěšně amplifikujících markerů byla optimalizace PCR, která zaručuje vysokou kvalitu výsledků u všech analyzovaných lokusů. Součástí optimalizace byla rovněž snaha zvýšit efektivitu práce a snížit náklady na analýzy, proto byly jednotlivé markery kombinovány do multiplexů.

Mikrosatelitní markery mají svá specifika a několik nevýhod, které mohou negativně zkreslovat získané údaje. Největší problém u cpSSR může působit efekt tzv. „netemplátového A“ či „+A“, který je průvodním jevem amplifikace SSR lokusů. Jedná se o vlastnost řady DNA polymeráz, včetně nejčastěji používané *Taq* polymerázy, které mají tendenci na konec amplifikovaného produktu přidávat navíc jeden nukleotid (typicky adenin) oproti templátu (Smith et al., 1995). Vzhledem k tomu, že u chloroplastů tvoří mikrosatelity především mononukleotidové repetice A či T nukleotidů, může kvůli tomu snadno dojít k záměně za skutečnou alelu. Z toho důvodu byla použita speciální Hot Start Phusion II polymeráza (Thermo Fisher Scientific), která netemplátové A nevytváří. Existují i další možná řešení k zajištění konzistentních výsledků. Z toho důvodu je důležité zajistit, aby se netemplátové A vyskytovalo nebo naopak nevyskytovalo u všech amplifikovaných produktů. Mezi standardní způsoby napomáhající tvorbě +A produktů patří přidávání tzv. PIG-tail sekvence (GTTTCTT)

na 5' konec R primeru (Brownstein et al., 1996) nebo prodloužení doby finální elongace na 30 až 60 minut (Kimpton et al., 1993). Naopak k odstranění +A lze použít restriční štěpení vhodnou exonukleázou po PCR amplifikaci nebo přímo polymerázu s 3'–5' exonukleázovou aktivitou, jakou je třeba *Pfu* polymeráza (Stratagene - manual), Bestaq polymeráza (abm - manual) či námi použitá Hot Start Phusion II (Thermo scientific - manual).

Dalším častým problémem bývá výskyt tzv. koktavých produktů, což platí zejména pro di-, tri-, tetra- až n-nukleotidové repetice s tím, že s rostoucí délkou opakujícího se motivu množství koktavých produktů klesá (Ellegren, 2004). Koktavé produkty vznikají *in vitro* během PCR způsobem, který je podobný replikačnímu sklouznutí DNA polymerázy (viz kapitola 3.2.4.1). Výsledkem je produkt nebo série produktů lišících se velikostně nejčastěji o 1 či n-násobky opakujícího se motivu. Takovéto produkty mohou znesnadňovat především identifikaci skutečných heterozygotů (Hoffman et Amos, 2005). Pro mononukleotidové repetice však nebývají, dle naší zkušenosti, koktavé produkty problémem, což lze posoudit i z ilustračních obrázků 17 a 18, kde jsou zobrazeny alely jednotlivých lokusů.

Z výsledků optimalizace (viz kapitola 5.3) vyšlo najevo, že kvalitnější amplifikace je dosaženo zvýšením koncentrace  $Mg^{2+}$  a přidáním BSA. Obecně je známo, že s vyšší koncentrací  $Mg^{2+}$  dochází ke zvyšování  $T_m$  (teploty tání) primerů a zároveň snižování specifity při jejich nasedání na templátovou molekulu DNA (Limor et al., 2002). Vzhledem k vysoce pravděpodobnému výskytu bodových mutací v místech nasedání primerů byl požadavek na jejich nižší specifitu nezbytnou nutností pro amplifikaci řady lokusů. Zároveň však bylo ověřeno, jestli nevznikají artefakty PCR produktů, které by mohly znemožňovat identifikaci příslušných alel. U použitých mikrosatelitů byl zaznamenán jediný případ PCR artefaktu, pro lokus NTCP 26. V tomto lokusu se tvořil, kromě vlastní alely o velikosti 179 bp, u většiny genotypů menší produkt o velikosti 93 bp (obr. 18) a to jak v single, tak v multiplexové reakci. Jelikož se velikostně nepřekrýval s žádnou alelou ostatních lokusů, nebylo nutné daný marker vyřadit. V tomto lokusu byl rovněž zaznamenán výskyt tzv. „nulové“ alely. Podrobnější komentář tohoto jevu je popsán níže.

K dalšímu zlepšení napomohlo přidání BSA (bovinní sérum albuminu), které pomáhá odstranit nebo alespoň snížit negativní efekt řady látek fungujících jako inhibitory v PCR reakční směsi (Kreader, 1996). Chmelové rostliny vytvářejí pestrou paletu sekundárních metabolitů (silice, pryskyřice), které mohou mít podobný dopad na kvalitu amplifikace jako jiné látky u živočichů, např. moč, kolagen či melanin (Butler, 2012). Tímto způsobem lze vysvětlit zlepšení intenzity signálu a vyšší počet amplifikujících genotypů u variant s BSA

v kombinaci s nárůstem množství  $Mg^{2+}$ . Do PCR reakce mohou být přidávána i jiná aditiva zlepšující její výtěžnost (betain, PVP) nebo specifitu (formamid, PCR enhancer). V této práci byl v kombinaci s BSA testován PCR enhancer vyráběný firmou Top-Bio, který obsahuje látku TMA-oxalát. Příslušné aditivum by mělo zvyšovat specifitu na úkor výtěžnosti reakce (Kovářová et Dráber, 2000). Jak je patrné z obrázku 13 tak v případě některých genotypů působil PCR Enhancer jako inhibitor amplifikační reakce (viz varianty 5 vs. 7 na obr. 13). Proto, vzhledem k tomu, že tvorba nespecifických produktů nebyla problémem, byla vybrána varianta bez PCR enhanceru.

### 6.3 Studium diverzity a variability chmele

Kombinací alel z 10 studovaných lokusů bylo sestaveno 5 haplotypů označených jako haplo-a až haplo-e. Na základě analýzy získaných dat bylo zjištěno, že pouze u 6 lokusů existuje více rozdílných alel a jsou tedy polymorfní. S výjimkou lokusu NTCP 30, kde se vyskytly 3 alely, byly detekovány v ostatních lokusech pouze 2 varianty alel, přičemž frekvence alel ( $p_i$ ) v rámci celé kolekce genetických zdrojů byla pro  $p_1 \approx 0,7$  a pro  $p_2 \approx 0,3$ . V lokusu NTCP 30 je  $p_3 \approx 0,011$ , což odpovídá výskytu pouze u dvou genotypů sledovaného souboru 181 rostlin.

Z hlediska počtu detekovaných alel je třeba upozornit na výskyt tzv. „nulové alely“ v lokusu NTCP 26. Nulová alela je jev, při kterém u některých genotypů nedochází k amplifikaci vlivem mutace v místě nasedání některého z primerů nebo suboptimálních podmínek pro PCR (Dakin et Avise, 2004). Na základě komparativní analýzy mezi různými skupinami chmelů bylo zjištěno, že pouze u většiny amerických (93 %) a části kultivarů (26 %) se vyskytuje detekovatelný produkt o velikosti 179 bp. Naopak u všech evropských a 96 % kavkazských planých chmelů nebyla detekována žádná alela. Ačkoliv tedy byla nalezena v lokusu NTCP 26 pouze jediná alela, bylo zřejmé, že lokus vykazuje polymorfismus na úrovni sekvence, a proto byl „neamplifikující produkt“ pro potřeby další analýzy označen jako alela „72“. Lze samozřejmě namítnout, že mohl být problém v podmínkách PCR, a nikoliv mutaci. Tuto skutečnost nelze s jistotou vyloučit, ale jelikož byla provedena poměrně rozsáhlá optimalizace PCR a v ostatních lokusech u genotypů s nulovou alelou byly získány kvalitní amplikony, předpokládáme, že to není tento případ. Potenciálnímu zkreslení se nedá zabránit ani v případě rozhodnutí označit nevyskytující se produkt jako alelu „72“, protože není jasné, je-li stejná mutace příčinou selhání amplifikace. Obdobný problém se však týká i ostatních lokusů, protože jednotlivé alely jsou detekovány na základě rozdílné velikosti, a nikoliv sekvence. Důsledkem pak může být podhodnocení

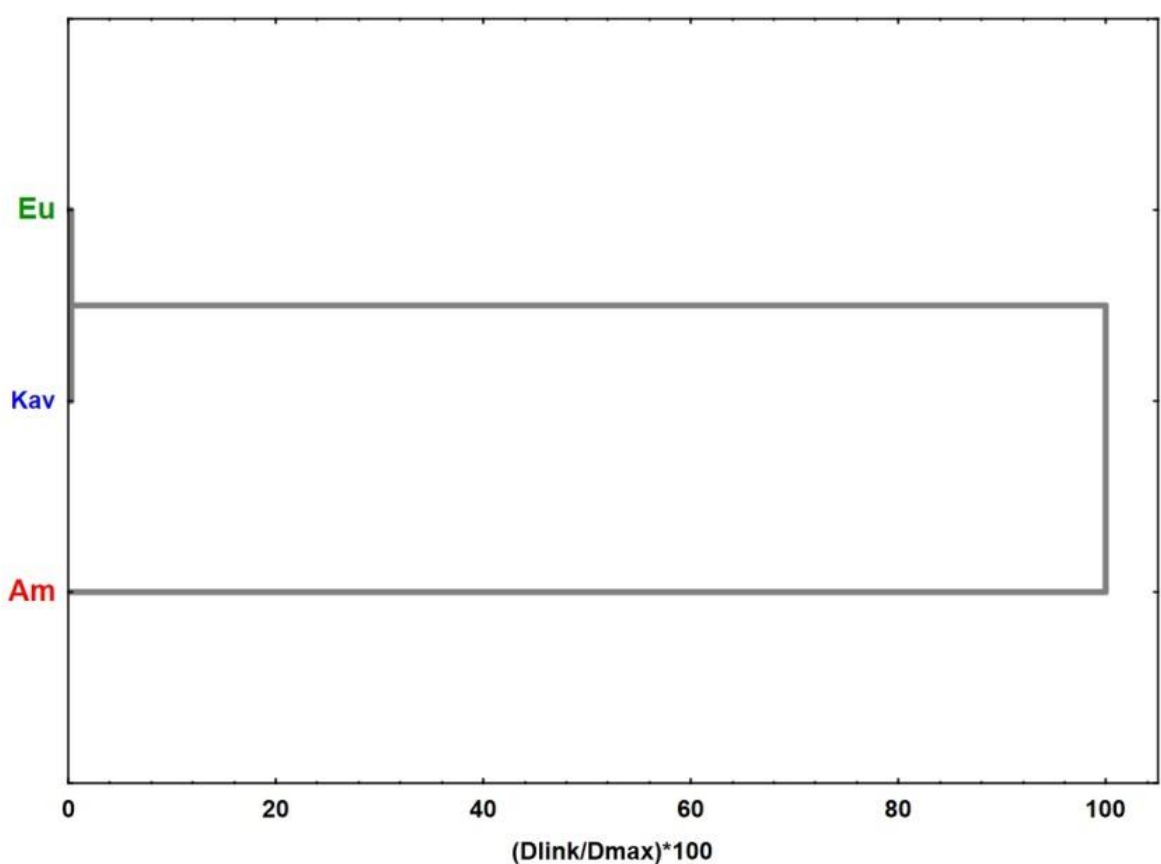
skutečné variability studovaného souboru genotypů, jelikož stejně velké amplikony nemusí mít shodnou sekvenci (Estoup et al., 2002).

Přestože bylo detekováno 5 haplotypů, v dané kolekci převažovaly pouze 2, a sice haplo-b (29 %) a haplo-e (69 %). Zbylé haplotypy haplo-a, haplo-c, haplo-d měly frekvenci 1,0; 0,5 a 0,5 %. Detailnější analýza distribuce jednotlivých haplotypů umožnila členění chmelů do několika kategorií. První typ rozdělení byl proveden na základě příslušnosti k planým nebo kulturním chmelům. Druhé členění se týkalo pouze planých chmelů, které byly zařazeny do jedné ze tří skupin podle geografického místa původu, a sice do skupiny evropské, kavkazské a americké. Zároveň bylo provedeno hodnocení genetické diverzity v rámci skupin ( $H_s$ ) a spočítán fixační index ( $F_{st}$ ). Porovnání planých a kulturních chmelů ukázalo stejný počet haplotypů, přičemž každá skupina měla jeden privátní haplotyp, tj. vyskytující se pouze v dané skupině. Pro kulturní chmely to byl haplo-c a pro plané chmely to byl haplo-d. Z hlediska genetické diverzity je patrné, že u planých chmelů je přibližně 3x vyšší (0,1 vs. 0,339; tab. 12), což částečně ovlivňuje i velikost souboru (42 kultivarů vs. 139 planých chmelů). Fixační index ukázal velmi malou divergenci mezi oběma skupinami v důsledku genetického driftu. Rozdílných výsledků bylo dosaženo členěním planých chmelů do zmiňovaných skupin. V tomto případě nejvyšší genetickou diverzitu vykázaly americké chmely ( $H_s = 0,066$ ), následované kavkazskými chmely ( $H_s = 0,014$ ), poslední byly evropské chmely, kde byla genetická diverzita dokonce nulová, což bylo způsobeno výskytem pouze jediného haplotypu. Naopak  $F_{st}$  ukazuje na vysokou diferenciaci mezi některými skupinami v důsledku malého či žádného genového toku. Grafické zobrazení rozdílů mezi skupinami v podobě dendrogramu vytvořeného na základě párových hodnot  $F_{st}$  mezi skupinami (viz tab. 14) je ukázáno na obr. 22. Zde je dobře patrná silná diferenciaci mezi evropskými a americkými chmely spolu s velmi malými rozdíly pro skupiny evropských a kavkazských chmelů.

**Tab. 14** Hodnoty  $F_{st}$  pro jednotlivé skupiny

	<b>Eu</b>	<b>Am</b>	<b>Kav</b>
<b>Eu</b>	0.000		
<b>Am</b>	0.354	0.000	
<b>Kav</b>	0.001	0.148	0.000

**Vysvětlivky:** Eu = Evropa, Kav = Kavkaz, Am = Amerika



**Obr. 22** Shluková analýza na základě hodnot  $F_{st}$  mezi skupinami planých chmelů  
**Vysvětlivky:** Eu = Evropa, Kav = Kavkaz, Am = Amerika

Z výsledků diplomové práce vyplývá existence minimálně dvou bioregionů – evropského a amerického a zároveň naznačují existenci třetího bioregionu, a sice kavkazského, což je v souladu s řadou dříve publikovaných studií. Souvislost s geografickým původem a výskytem, popř. frekvencí určitých haplotypů dokládá jak Peredo et al. (2010), tak Murakami et al. (2006). Murakamiho studie je v současné době jediná, rozsáhlá fylogenetická analýza chmele, která využívá i chloroplastových markerů. Přestože byla analýza provedena na základě sekvencí, detekoval Murakami et al. (2006) pouze jediný haplotyp pro evropské chmely naznačující jejich rychlou expanzi, která byla pravděpodobně podpořena antropologickým vlivem. Celkově nízký počet haplotypů, a tedy variability, je vysvětlován nedávným oddělením jednotlivých skupin a variet chmele na evoluční časové škále, jelikož k divergenci mezi *H. lupulus* a *H. japonicus* došlo před  $1,05\text{--}1,27 \times 10^6$  let a k oddělení evropských a amerických chmelů teprve před  $0,45\text{--}0,69 \times 10^6$  let (Murakami et al., 2006). Existenci těchto dvou bioregionů potvrzuje i řada dalších studií, které využívaly např. genomické SSR, AFLP či DArT markery (Jakše et al., 2004; Patzak et al., 2007; Howard et al., 2011). Zároveň však naznačují existenci skupiny třetí, a sice kavkazské (Patzak et al., 2010a; Patzak et al., 2010b; Howard et al., 2011). V této diplomové práci byly nalezeny velmi

malé rozdíly mezi evropskými a kavkazskými chmely, jelikož 96 % kavkazských chmelů sdílelo stejný haplotyp s evropskými. Nicméně chloroplastový genom patří mezi nejkonzervativnější v porovnání s mitochondriálním či jaderným genomem, u kterých je frekvence mutací řádově vyšší (Schlötterer, 2000). Proto je snazší detekovat případné rozdíly pomocí jaderných markerů.

Další zajímavý poznatek vyplynul z analýzy haplotypů u konkrétních kultivarů. Bylo zjištěno, že 10 kultivarů má haplotyp odpovídající americké skupině chmelů. Jedná se o kultivary Magnum, Outeniqua, Agnus, Vital, Merkur, Alliance, Columbus, Banner, Silný a Olympic. U pěti z těchto kultivarů (Magnum, Agnus, Vital, Alliance, Banner) se z dostupných zdrojů podařilo prokázat americký původ cytoplazmy. Všechny tyto kultivary rodokmenově spojuje v mateřské linii se vyskytující kultivar Brewer's Gold (USDA - <http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>; Krofta et al., 2002; Krofta et al., 2013). Jak uvádí webové stránky amerického ministerstva zemědělství (USDA – United States Department of Agriculture), obsahující databázi genetických zdrojů v rámci ARS (Agricultural Research Service), mateřskou rostlinou byl genotyp označený jako „Wild Manitoba BB1“. Na stránkách je doslova napsáno: „The mother plant BB1 was obtained in 1916 as a cutting from a wild hop growing at Morden, Manitoba. It was believed to have been a genuine wild North American hop.“, což lze volně přeložit jako „Mateřská rostlina BB1 byla získána v roce 1916 z planého chmele rostoucího v Mordenu, Manitoba. Předpokládá se, že se jedná o skutečný planý severoamerický chmel.“

## 7 Závěr

Lze konstatovat, že jednotlivé dílčí cíle práce byly splněny. Stručné shrnutí poznatků je uvedeno v následujících bodech.

- Byla provedena bioinformatická analýza dat pomocí genetických databází.
- Následně byla na testovacích vzorcích chmele empiricky ověřena funkce vybraných markerů. A dále byla provedena optimalizace podmínek pro jejich amplifikaci.
- Je možné říci, že první hypotéza byla potvrzena, jelikož z 23 cpSSR markerů navržených původně pro tabák (*Nicotiana tabacum* L.) se podařilo u chmele aplikovat celkem 10 markerů v podobě dvou multiplexů – M1 a M2.
- Ze získaných 10 markerů bylo 6 polymorfních, přičemž v každém z těchto polymorfních lokusů byly nalezeny dvě, popř. tři alely.
- Hypotézu, že chloroplastové mikrosatelity poskytují nový zdroj dat ke zkoumání diverzity chmele lze také považovat za potvrzenou, jelikož se podařilo pomocí navržených markerů vyhodnotit diverzitu na kolekci planých chmelů pocházejících z genobanky Chmelařského institutu, s. r. o.
- Multiplexy M1 a M2 byly otestovány na 225 genotypech jak kulturního, tak planého chmele různého geografického původu. Celkem bylo pomocí těchto cpSSR markerů nalezeno 5 haplotypů (a–e), přičemž haplotypy b a e byly u testovaných chmelů zastoupeny nejvíce (> 95 %).
- Na základě porovnání výsledků získaných pomocí cpSSR markerů s rodokmeny části studovaných kultivarů byl u některých z nich potvrzen původ americké cytoplazmy.
- Z hlediska geografického původu byly chmely rozděleny minimálně do dvou bioregionů, a to do evropského a amerického. Výsledky také naznačují možnost existence třetího bioregionu, a sice kavkazského. Toto rozdělení je v souladu s výsledky dříve provedených studií.



## 8 Seznam literatury

abm, Inc. Bestaq DNA Polymerase. 2015 [cit. 8. 4. 2015], Dostupné z<<http://www.abmgood.com/PCR/pdfs/Bestaq-DNA-polymerase.pdf>>.

Bao, J. S., Corke, H., Sun, M. 2002. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 105(6-7). 898-905.

Ben-Ayed, R., Grati-Kamoun, N., Sans-Grout, C., Moreau, F., Rebai, A. 2012. Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *European Food Research and Technology*. 234(2). 263-271.

Bendich, A. J. 2004. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *The Plant Cell Online*. 16(7). 1661-1666.

Birky, C. W. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu Rev Genet*. 35(1). 125-148.

Bock, R., Timmis, J. N. 2008. Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays*. 30(6). 556-566.

Brady, J., Scott, N., Thomas, M. 1996. DNA typing of hops (*Humulus lupulus*) through application of RAPD and microsatellite marker sequences converted to sequence tagged sites (STS). *Euphytica*. 91(3). 277-284.

Brownstein, M. J., Carpten, J. D., Smith, J. R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*. 20(6). 1004-1006, 1008-1010.

Bryan, G. J., Mcnicoll, J., Ramsay, G., Meyer, R. C., De Jong, W. S. 1999. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics*. 99(5). 859-867.

Butler, J. M. 2012. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press San Diego. ISBN 978-0-12-374513-2.

Consortium, T. I. W. G. S. 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 345(6194).

Craft, K. J., Owens, J. D., Ashley, M. V. 2007. Application of plant DNA markers in forensic botany: genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic science international*. 165(1). 64-70.

Cronn, R., Liston, A., Parks, M., Gernandt, D. S., Shen, R., Mockler, T. 2008. Multiplex sequencing of plant chloroplast genomes using Solexa sequencing-by-synthesis technology. *Nucleic Acids Res*. 36(19). e122.

Cui, L., Veeraraghavan, N., Richter, A., Wall, K., Jansen, R. K., Leebens-Mack, J., Makalowska, I., Depamphilis, C. W. ChloroplastDB: the chloroplast genome database. *Nucleic Acids Research*. [online] 2006. 34. 692-696. Dostupné z<<http://chloroplast.cbio.psu.edu/index.html>>.

Cummings, M., Nugent, J., Olmstead, R., Palmer, J. 2003. Phylogenetic analysis reveals five independent transfers of the chloroplast gene *rbcL* to the mitochondrial genome in angiosperms. *Current Genetics*. 43(2). 131-138.

Dakin, E. E., Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* (Edinb). 93(5). 504-509.

Dresselhaus, T., Cordts, S., Heuer, S., Sauter, M., Lörz, H., Kranz, E. 1999. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Molecular and General Genetics MGG*. 261(2). 416-427.

Dvořák, J., Dostálek, P., Kellner, V., Čejka, P., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M. 2008. Význam oxidu siřičitého v pivu. Část 3.: Faktory ovlivňující tvorbu oxidu siřičitého během pivovarského kvašení. *Kvasný průmysl*. 54(5). 142-148.

Ebert, D., Peakall, R. 2009. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. *Mol Ecol Resour*. 9(3). 673-690.

Eliades, N.-G., Gailing, O., Leinemann, L., Fady, B., Finkeldey, R. 2011. High genetic diversity and significant population structure in *Cedrus brevifolia* Henry, a narrow endemic Mediterranean tree from Cyprus. *Plant Systematics and Evolution*. 294(3-4). 185-198.

Eliades, N. G., Eliades, D. G. 2009. Haplotype analysis: software for analysis of haplotypes data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany.

Ellegren, H. 2000. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature genetics*. 24(4). 400-402.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 5(6). 435-445.

Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J. M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular ecology*. 11(9). 1591-1604.

Fan, H., Chu, J.-Y. 2007. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 5(1). 7-14.

Gemayel, R., Vincens, M. D., Legendre, M., Verstrepen, K. J. 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu Rev Genet*. 44. 445-477.

Genbank. Rockville Pike, Bethesda MD, USA National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 21. 10. 2014 [cit. 25. 10. 2014], Dostupné z<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>.

Gilmore, S., Peakall, R., Robertson, J. 2007. Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of *Cannabis sativa*. *Forensic science international*. 172(2–3). 179-190.

Grabowska-Joachimciak, A., Śliwińska, E., Piguła, M., Skomra, U., Joachimciak, A. J. 2006. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc.(Cannabaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 75(3). 207-214.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Leger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour*. 11(4). 591-611.

Guo, W. J., Ling, J., Li, P. 2009. Consensus features of microsatellite distribution: Microsatellite contents are universally correlated with recombination rates and are preferentially depressed by centromeres in multicellular eukaryotic genomes. *Genomics*. 93(4). 323-331.

Gupta, P. K., Varshney, R. K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. 113(3). 163-185.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. 95-98.

Higgs, D. C. 2009. The chloroplast genome. *Academic Press London*, 871-891 p. ISBN 978-0-12-370873-1.

Hoffman, J. I., Amos, W. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol Ecol*. 14(2). 599-612.

Holleley, C. E., Geerts, P. G. 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*. 46(7). 511-517.

Howard, E. L., Whittock, S. P., Jakše, J., Carling, J., Matthews, P. D., Probasco, G., Henning, J. A., Darby, P., Cerenak, A., Javornik, B., Kilian, A., Koutoulis, A. 2011. High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilising diversity arrays technology (DArT). *Theoretical and Applied Genetics*. 122(7). 1265-1280.

Chacón, S. M. I., Pickersgill, B., Debouck, D. G., Arias, J. S. 2007. Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution*. 266(3-4). 175-195.

Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D. N., Davison, L. J., Deka, R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(3). 1041-1046.

- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y. A., Huang, S., Gmitter Jr, F. G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 112(7). 1248-1257.
- Cheng, Y., De Vicente, M. C., Meng, H., Guo, W., Tao, N., Deng, X. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiology*. 25(6). 661-672.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Volckaert, F. a. M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255(1-4). 1-29.
- Jain, S., Joshi, R., Jatwa, K., Sharma, A., Mahajan, S. 2014. DNA microsatellites: a review. *PharmaTutor*. 2(8). 79-86.
- Jakše, J., Satovic, Z., Javornik, B. 2004. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome*. 47(5). 889-899.
- Jakše, J., Stajner, N., Kozjak, P., Cerenak, A., Javornik, B. 2008. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Breeding*. 21(2). 139-148.
- Jansen, R. K., Raubeson, L. A., Boore, J. L., Depamphilis, C. W., Chumley, T. W., Haberle, R. C., Wyman, S. K., Alverson, A. J., Peery, R., Herman, S. J., Fourcade, H. M., Kuehl, J. V., Mcneal, J. R., Leebens-Mack, J., Cui, L. 2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol*. 395. 348-384.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177(3). 309-334.
- Karlov, G. I., Danilova, T. V., Horlemann, C., Weber, G. 2003. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica*. 132(2). 185-190.
- Khanna, K. R. 1990. Biochemical aspects of crop improvement. Taylor & Francis. ISBN 9780849354182.
- Kimpton, C. P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E. S., Adams, M. 1993. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl*. 3(1). 13-22.
- Koelling, J., Coles, M., Matthews, P., Schwekendiek, A. 2012. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. *Molecular Breeding*. 30(1). 479-484.
- Kovárová, M., Dráber, P. 2000. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research*. 28(13). e70-e70.
- Kreider, C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(3). 1102-1106.

- Krofta, K., Nesvadba, V., Čepička, J., Mikyška, A. 2002. Agnus – první česká vysokoobsažná odrůda chmele. *Kvasný průmysl*. 48(9). 239-244.
- Krofta, K., Patzak, J., Nesvadba, V., Mikyška, A., Slabý, M., Čejka, P. 2013. VITAL – česká hybridní odrůda chmele – část I. *Kvasný průmysl*. 59(1). 2-13.
- Lawrence, M. E., Possingham, J. V. 1986. Microspectrofluorometric Measurement of Chloroplast DNA in Dividing and Expanding Leaf Cells of *Spinacia oleracea*. *Plant Physiology*. 81(2). 708-710.
- Lawson, M. J., Zhang, L. 2006. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes. *Genome biology*. 7(2). R14.
- Legendre, M., Pochet, N., Pak, T., Verstrepen, K. J. 2007. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome research*. 17(12). 1787-1796.
- Levinson, G., Gutman, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*. 4(3). 203-221.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Nevo, E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol*. 21(6). 991-1007.
- Limor, J. R., Lal, A. A., Xiao, L. 2002. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* Parasites That Are Pathogenic for Humans by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(7). 2335-2338.
- López-Vinyallonga, S., López-Alvarado, J., Constantinidis, T., Susanna De La Serna, A., Garcia-Jacas, N. 2011. Microsatellite cross-species amplification in the genus *Centaurea* (Compositae). *Collectanea Botanica*. 30. 17-27.
- Mardis, E. R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 9. 387-402.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D. 2002. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(19). 12246-12251.
- Mcfadden, G. I. 2001. Chloroplast origin and integration. *Plant Physiology*. 125(1). 50-53.
- Meskauskas, A. Compute reverse complement of the nucleotide sequence [online] 2013. [cit. 2014-10-25]. Dostupné z <<http://reverse-complement.com/>>.
- Ming, R., Bendahmane, A., Renner, S. S. 2011. Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*. 62(1). 485-514.

- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T., Yano, M., Bhatia, C., Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*. 3(2). 87-103.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature genetics*. 30(2). 194-200.
- Mrázek, J., Guo, X., Shah, A. 2007. Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(20). 8472-8477.
- Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Pais, M. S. S., Seigner, E., Lutz, A., Svoboda, P. 2006. Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity*. 97(1). 66-74.
- Natsume, S., Takagi, H., Shiraishi, A., Murata, J., Toyonaga, H., Patzak, J., Takagi, M., Yaegashi, H., Uemura, A., Mitsuoka, C., Yoshida, K., Krofta, K., Satake, H., Terauchi, R., Ono, E. 2014. The draft genome of hop (*Humulus lupulus*), an essence for brewing. *Plant and Cell Physiology*.
- Navascues, M., Emerson, B. C. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Mol Ecol*. 14(5). 1333-1341.
- Neve, R. A. 1991. Hops. Chapman and Hall. ISBN 0412303302.
- Ogihara, Y., Isono, K., Kojima, T., Endo, A., Hanaoka, M., Shiina, T., Terachi, T., Utsugi, S., Murata, M., Mori, N., Takumi, S., Ieko, K., Gojobori, T., Murai, R., Murai, K., Matsuoka, Y., Ohnishi, Y., Tajiri, H., Tsunewaki, K. 2000. Chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) chloroplast genome: Complete sequence and contig clones. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18(3). 243-253.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29(2). 294-307.
- Pastyřík, V. 1989. Chmelařství. Výstavnictví zemědělství a výživy. ISBN 9788070840160.
- Patzak, J., Nesvadba, V., Henychová, A., Krofta, K. 2010a. Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38(2). 136-145.
- Patzak, J., Nesvadba, V., Krofta, K., Henychova, A., Marzoev, A. I., Richards, K. 2010b. Evaluation of genetic variability of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Canada and the Caucasus region by chemical and molecular methods. *Genome*. 53(7). 545-557.
- Patzak, J., Vrba, L., Matoušek, J. 2007. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome*. 50(1). 15-25.
- Pearson, C. E., Kerrie Nichol, E., Cleary, J. D. 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*. 6(10). 729-742.

- Peredo, E., Ángeles Revilla, M., Reed, B., Javornik, B., Cires, E., Prieto, J., Arroyo-García, R. 2010. The influence of European and American wild germplasm in hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 57(4). 575-586.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G. G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol Ecol*. 14(3). 689-701.
- Pillay, M., Kenny, S. T. 1994. Chloroplast DNA differences between cultivated hop, *Humulus lupulus* and the related species *H. japonicus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 89(2-3). 372-378.
- Pokhriyal, B., Thorat, K., Limaye, D., Joshi, Y., Kadam, V., Dubey, R. 2012. Microsatellite markers – a novel tool in molecular genetics. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2(2). 397- 412.
- Polley, A., Ganal, M. W., Seigner, E. 1997. Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. *Genome*. 40(3). 357-361.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 6(11). 847-846.
- Provan, J., Biss, P. M., Mcmeel, D., Mathews, S. 2004. Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Molecular Ecology Notes*. 4(2). 262-264.
- Provan, J., Powell, W., Hollingsworth, P. M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 16(3). 142-147.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N. J., Goldstein, D. B., Powell, W. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*. 153(2). 943-947.
- Putman, A. I., Carbone, I. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and evolution*. 4(22). 4399-4428.
- Rajendrakumar, P., Biswal, A. K., Balachandran, S. M., Srinivasarao, K., Sundaram, R. M. 2007. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 23(1). 1-4.
- Reeves, P. A., Richards, C. M. 2011. Species delimitation under the general lineage concept: an empirical example using wild North American hops (Cannabaceae: *Humulus lupulus*). *Systematic Biology*. 60(1). 45-59.
- Renner, S. S., Ricklefs, R. E. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany*. 596-606.
- Richard, G. F., Kerrest, A., Dujon, B. 2008. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 72(4). 686-727.

- Rybáček, V., Fric, V., Havel, J., Libich, V., Kříž, J., Makove, K., Petrlik, Z., Sachl, J., Srp, A., Šnobl, J., Vančura, M. 1980. Chmelařství. SZN, 426 p. ISBN 07-068-80.
- Segarra-Moragues, J. G., Villar, L., López, J., Pérez-Collazos, E., Catalán, P. 2007. A new Pyrenean hybrid *Cirsium* (Asteraceae) as revealed by morphological and molecular analyses. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 154(3). 421-434.
- Sharopova, N., McMullen, M. D., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardiner, J., Bergstrom, D., Houchins, K., Melia-Hancock, S., Musket, T., Duru, N., Polacco, M., Edwards, K., Ruff, T., Register, J. C., Brouwer, C., Thompson, R., Velasco, R., Chin, E., Lee, M., Woodman-Clikeman, W., Long, M. J., Liscum, E., Cone, K., Davis, G., Coe, E. H., Jr. 2002. Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular Biology*. 48(5-6). 463-481.
- Shephard, H. L., Parker, J. S., Darby, P., Ainsworth, C. C. 2000. Sexual development and sex chromosomes in hop. *New phytologist*. 148(3). 397-411.
- Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. 2010. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet*. 19(R2). R227-240.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 109(6). 365-371.
- Skof, S., Cerenak, A., Jakse, J., Bohanec, B., Javornik, B. 2012. Ploidy and sex expression in monoecious hop (*Humulus lupulus*). *Botany*. 90(7). 617-626.
- Small, E. 1978. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*. 37-76.
- Smith, J. R., Carpten, J. D., Brownstein, M. J., Ghosh, S., Magnuson, V. L., Gilbert, D. A., Trent, J. M., Collins, F. S. 1995. Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome research*. 5(3). 312-317.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J., Matalová, A. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. ISBN 9788021048522.
- Söreide, K., Janssen, E. a. M., Söiland, H., Körner, H., Baak, J. P. A. 2006. Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*. 93(4). 395-406.
- Stägel, A., Portis, E., Toppino, L., Rotino, G. L., Lanteri, S. 2008. Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant. *BMC Genomics*. 9(1). 357.
- Statsoft. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Dostupné z<<http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features/Version-12>>.
- Stratagene. Pfu DNA Polymerase. 2004 [cit. 8. 4. 2015], Dostupné z<[http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Product\\_manuals\\_attach/pfu.pdf](http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/data/Product_manuals_attach/pfu.pdf)>.



Subirana, J. A., Messeguer, X. 2008. Structural families of genomic microsatellites. *Gene*. 408(1). 124-132.

Tangphatsornruang, S., Sangsakru, D., Chanprasert, J., Uthapaisanwong, P., Yoocha, T., Jomchai, N., Tragoonrung, S. 2010. The chloroplast genome sequence of mungbean (*Vigna radiata*) determined by high-throughput pyrosequencing: structural organization and phylogenetic relationships. *DNA Res.* 17(1). 11-22.

Thermo-Scientific. Thermo Scientific Phusion and Phire DNA Polymerases. 2014 [cit. 8. 4. 2015], Dostupné z<<https://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/PCR/pdfs/brochure-phusion-phire-dna-polymerases.pdf>>.

Thomas, G. G., Schwabe, W. W. 1969. Factors controlling flowering in the hop (*Humulus lupulus* L.). *Annals of Botany*. 33(4). 781-793.

Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*. 10(7). 967-981.

ÚKZÚZ. Sklizňové plochy chmelnic k 20. 8. 2014. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. Ministerstvo zemědělství 15.9.2014 [cit. 8. 4. 2015], Dostupné z<<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/trvale-kultury/registrace/registrace-chmelnic/skliznove-plochy-chmelnic-k-20-8-2014.html>>.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. [online] 2012. 40. e115. Dostupné z<<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>>.

USDA. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture 21. 10. 2014 [cit. 8. 4. 2015], Dostupné z<<http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>>.

Vallone, P. M., Butler, J. M. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*. 37(2). 226-231.

Van Bakel, H., Stout, J. M., Cote, A. G., Tallon, C. M., Sharpe, A. G., Hughes, T. R., Page, J. E. 2011. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biol.* 12(10). 1-17.

Varshney, R., Mahendar, T., Aggarwal, R., Börner, A. Genic molecular markers in plants: development and applications. In: Varshney, R., Tuberosa, R. (ed.). *Genomics-Assisted Crop Improvement*. Springer Netherlands, 2007, p. 13-29.

Varshney, R. K., Graner, A., Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23(1). 48-55.

Vendramin, G. G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular ecology*. 5(4). 595-598.

Vent, L., Antipovič, D., Beránek, F., Blatný, C., Drexler, O., Fiala, V., Fric, V., Gesner, M., Hautke, P., Klupal, I., Kříž, J., Libich, V., Pastyřík, V., Pejml, K., Petrlík, Z., Petříček, D.,

- Průša, V., Rybáček, V., Sachl, J., Skládal, V., Stejskal, J., Srp, A., Štys, Z., Vančura, M., Zajíček, E., Zelenka, V. 1963. Chmelářství. Státní zemědělské nakladatelství Praha.
- Victoria, F. C., Da Maia, L. C., De Oliveira, A. C. 2011. In silico comparative analysis of SSR markers in plants. *BMC plant biology*. 11(1). 15.
- Von Stackelberg, M., Rensing, S. A., Reski, R. 2006. Identification of genic moss SSR markers and a comparative analysis of twenty-four algal and plant gene indices reveal species-specific rather than group-specific characteristics of microsatellites. *BMC plant biology*. 6. 1-14.
- Wang, X. W., Kaga, A., Tomooka, N., Vaughan, D. A. 2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. *Theoretical and Applied Genetics*. 109(2). 352-360.
- Weising, K., Gardner, R. C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*. 42(1). 9-19.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, second edition. CRC Press. ISBN 9781420040043.
- Westergaard, M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. Academic Press, 217-281 p. ISBN 0065-2660.
- Whitelaw, C. A., Barbazuk, W. B., Perteau, G., Chan, A. P., Cheung, F., Lee, Y., Zheng, L., Van Heeringen, S., Karamycheva, S., Bennetzen, J. L., Sanmiguel, P., Lakey, N., Bedell, J., Yuan, Y., Budiman, M. A., Resnick, A., Van Aken, S., Utterback, T., Riedmuller, S., Williams, M., Feldblyum, T., Schubert, K., Beachy, R., Fraser, C. M., Quackenbush, J. 2003. Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration. *Science*. 302(5653). 2118-2120.
- Wild, P. J., Fuchs, T., Stoehr, R., Zimmermann, D., Frigerio, S., Padberg, B., Steiner, I., Zwarthoff, E. C., Burger, M., Denzinger, S., Hofstaedter, F., Kristiansen, G., Hermanns, T., Seifert, H.-H., Provenzano, M., Sulser, T., Roth, V., Buhmann, J. M., Moch, H., Hartmann, A. 2009. Detection of urothelial bladder cancer cells in voided urine can be improved by a combination of cytology and standardized microsatellite analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 18(6). 1798-1806.
- Xiong, A.-S., Peng, R.-H., Zhuang, J., Gao, F., Zhu, B., Fu, X.-Y., Xue, Y., Jin, X.-F., Tian, Y.-S., Zhao, W., Yao, Q.-H. 2009. Gene duplication, transfer, and evolution in the chloroplast genome. *Biotechnology Advances*. 27(4). 340-347.
- Yang, M., Zhang, X., Liu, G., Yin, Y., Chen, K., Yun, Q., Zhao, D., Al-Mssallem, I. S., Yu, J. 2010. The complete chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *PLoS ONE*. 5(9). e12762.
- Zázvorka, V., Zima, F. 1956. Chmelářství. Státní zemědělské nakladatelství.

Zhang, H., Sun, J., Wang, M., Liao, D., Et Al. 2007. Genetic structure and phylogeography of rice landraces in Yunnan, China, revealed by SSR. *Genome*. 50(1). 72-83.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. A Greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. [online] 2000. 7. 203-214. Dostupné z<[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)>.

## 9 Seznam obrázků a tabulek

### 9.1 Seznam obrázků

<b>Obr. 1</b> Ohraničené oblasti ilustrují přibližná místa výskytu tří severoamerických variet <i>Humulus lupulus</i> L. určených dle Small (1978). .....	11
<b>Obr. 2</b> Obecně uznávaná systematika chmele (Small, 1978; Neve, 1991) .....	12
<b>Obr. 3</b> Podzemní část chmelové rostliny (Rybáček a kol., 1980) .....	14
<b>Obr. 4</b> Listy chmele otáčivého (Rybáček a kol., 1980) .....	15
<b>Obr. 5</b> Hlávka a její části (Rybáček a kol., 1980) .....	15
<b>Obr. 6</b> Samičí květenství (Rybáček a kol., 1980) .....	16
<b>Obr. 7</b> Samčí květenství (Rybáček a kol., 1980) .....	16
<b>Obr. 8</b> Důležité charakteristiky tandemových repetic, upraveno dle Gemayel et al. (2010) ...	20
<b>Obr. 9</b> Mechanismus replikačního sklouznutí, upraveno dle Ellegren (2004) .....	24
<b>Obr. 10</b> Bodový graf alignmentu chloroplastomu tabáku (Z00044.2) – osa y a konopí (KP274871.1) – osa x .....	39
<b>Obr. 11</b> Alignment sekvencí pro marker NTCP 8 .....	40
<b>Obr. 12</b> Optimalizace markeru NTCP 8 Fb, varianta 1–3 (zprava doleva) .....	41
<b>Obr. 13</b> Optimalizace markeru NTCP 8 Fb, varianta 4–7 (zprava doleva a ze shora dolů) ....	41
<b>Obr. 14</b> Testování markeru NTCP 8 Fb, varianty 7 na 24 náhodných vzorcích chmele .....	42
<b>Obr. 15</b> Testování varianty 7 u markerů NTCP 3, NTCP 7, NTCP 9 (horní část obrázku, zprava doleva), NTCP 23, NTCP 28, NTCP 37 (spodní část obrázku, zprava doleva) v singleplex uspořádání .....	42
<b>Obr. 16</b> Testování všech nově navržených markerů NTCP 33, NTCP 12, NTCP 18, NTCP 30, NTCP 26, NTCP 29, NTCP 30b, NTCP 40 (zprava doleva) .....	43
<b>Obr. 17</b> Výsledný multiplex M1 .....	44
<b>Obr. 18</b> Výsledné multiplexy M2 u kultivaru – kult 40 a amerického genotypu chmele – USA 51 (ze shora dolů) .....	45
<b>Obr. 19</b> Frekvence haplotypů u genobanky .....	47
<b>Obr. 20</b> Frekvence haplotypů planých a kulturních chmelů .....	47
<b>Obr. 21</b> Frekvence haplotypů pro chmely původem z Evropy, Ameriky a Kavkazu .....	48
<b>Obr. 22</b> Shluková analýza na základě hodnot $F_{st}$ mezi skupinami planých chmelů .....	54

### 9.2 Seznam tabulek

<b>Tab. 1</b> Kapilární elektroforéza – podmínky separace .....	31
<b>Tab. 2</b> Teplotní profil PCR testování jednotlivých cpSSR .....	32
<b>Tab. 3</b> Sekvence nově navržených primerů R .....	33
<b>Tab. 4</b> Teplotní profil PCR pro amplifikaci na sekvenaci .....	34
<b>Tab. 5</b> Teplotní profil pro sekvenační reakci .....	34
<b>Tab. 6</b> Sekvence nově navržených primerů F pro NTCP 8 .....	35
<b>Tab. 7</b> Varianty testované při optimalizaci NTCP 8 Fb .....	36
<b>Tab. 8</b> Teplotní profil PCR pro výsledné multiplexy M1 a M2 .....	37
<b>Tab. 9</b> Počty bodových mutací u primerů F a R na základě alignmentu tabáku a konopí .....	38
<b>Tab. 10</b> Haplotypy a– e .....	46
<b>Tab. 11</b> Frekvence haplotypů u porovnávaných skupin .....	46
<b>Tab. 12</b> Intra a interpopulační analýza planých a kulturních chmelů .....	48
<b>Tab. 13</b> Intra a interpopulační analýza chmelů původem z Evropy, Ameriky a Kavkazu .....	48
<b>Tab. 14</b> Hodnoty $F_{st}$ pro jednotlivé skupiny .....	53

## 10 Seznam zkratek

**AFLP** = délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)  
**ARS** = (Agricultural Research Service)  
**bp** = pár bází (base pair)  
**BSA** = bovinní sérum albuminu (Bovine Serum Albumin)  
**cpDNA** = chloroplastová DNA (chloroplast DNA)  
**cpSSR** = chloroplastové SSR (chloroplast SSR)  
**DAPI** = 4',6-diamidino-2-fenylindol (4',6-diamidino-2phenylindole)  
**DNA** = deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)  
**dNTP** = deoxynukleotid-5'-trifosfát (deoxynucleotide-5'-triphosphate)  
**EST-SSR** = mikrosatelitní exprimované úseky (Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeat)  
**FISH** = fluorescenční *In Situ* hybridizace (Fluorescent *In Situ* Hybridization)  
**F<sub>st</sub>** = fixační index (Fixation index)  
**H<sub>s</sub>** = genetická diverzita v rámci skupiny (Gene diversity within each population)  
**IR** = invertované repetice (Inverted Repeat)  
**LSC** = (Large single-copy region)  
**MAS** = markerově asistovaná selekce (Marker Assisted Selection)  
**MMR** = opravný systém (Mismatch Repair System)  
**mtSSR** = mitochondriální SSR (mitochondrial SSR)  
**NGS** = sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)  
**nuSSR** = jaderné SSR (nuclear SSR)  
**PVP** = polyvinylpyrrolidon (polyvinylpyrrolidone)  
**PCR** = polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)  
**RAPD** = náhodná amplifikace polymorfní DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)  
**RNA** = ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)  
**SSC** = (Small single-copy region)  
**SSM** = replikační sklouznutí (Single Strand Mismatching)  
**SSR** = sekvenčně jednoduché repetice (Simple Sequence Repeat), synonymum pro STR  
**STR** = krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeat)  
**T<sub>a</sub>** = anelační teplota (annealing temperature)  
**Taq polymeráza** = polymeráza z *Thermus aquaticus*  
**T<sub>m</sub>** = teplota tání (melting temperature)  
**USDA** = Ministerstvo zemědělství USA (United States Department of Agriculture)  
**UTR** = nepřekládané oblasti (untranslated regions)

## 11 Přílohy

**Příloha 1** Seznam kultivarů

1	ČR	Osvaldův klon 147
2	ČR	Mastýřovický
3	ČR	Osvaldův klon 31
4	ČR	Roudnický
5	ČR	Osvaldův klon 55
6	ČR	Semšův
7	ČR	Planý
8	Polsko	D Polsko
9	Anglie	Wye Early Bird
10	Anglie	Early bird Golding
11	Německo	Au-Hallertau
12	Anglie	Whitbread 1147
13	Slovinsko	Styrie
14	Slovinsko	Aurora
15	ČR	Aromat
16	Slovinsko	Ahil
17	Německo	klon Ascherslaben V-KAV
18	Rakousko	Malling
19	Anglie	Progress
20	Anglie	Alliance
21	Anglie	Wye Viking
22	Německo	Hallertauer Gold
23	Rusko	klon 50
24	Rusko	Brjanskij
25	Německo	Magnum
26	USA	Columbus
27	JAR	Outeniqua
28	ČR	Harmonie
29	Ukrajina	Aromat Polesja
30	ČR	M 2/27
31	Německo	Taurus
32	ČR	Agnus
33	Anglie	Herold
34	Polsko	Zula
35	Polsko	Iunga
36	ČR	Vital
37	Německo	Merkur
38	Německo	Saphir
39	Slovinsko	Cerera
40	Polsko	Sybilla
41	Německo	Herkules
42	USA	Banner
43	Ukrajina	Zaklad
44	Ukrajina	Smena
45	Polsko	klon 34
46	Maďarsko	Francie F8
47	Ukrajina	Silnyj
48	USA	Olympic