

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Šárka Grygarová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Genetické markery pro studium vnitrodruhové
variability rakytníku řešetlákového
(*Hippophae rhamnoides*)**

Bakalářská práce

Šárka Grygarová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Šárka GRYGAROVÁ
Osobní číslo: R19889
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Genetické markery pro studium vnitrodruhové variability rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace DNA vybraných kultivarů rakytníku řešetlákového s využitím primerů pro polymorfni mikrosatelity.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Wang, A., Zhang, Q., Wan, D., Yang, Y., Liu, J. (2008): Nine microsatellite DNA primers for *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae). *Conservation Genetics*, 9: 969–971.
2. Gaskin, J.F., Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M. (2013): Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*; Elaeagnaceae). *Applications in Plant Sciences*, 1(9): 1300013.
3. Jain, A., Chaudhary, S., Sharma, P.C. (2014): Mining of microsatellites using next generation sequencing of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 115–123.
4. Lācis, G., Kota-Dombrovska, I. (2014): Assessment of genetic diversity of Latvian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) germplasm using molecular markers. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101, 333–340.
5. Li, H., Ruan, C., Ding, J., Li, J., Wang, L., Tian, X. (2020): Diversity in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) accessions with different origins based on morphological characteristics, oil traits, and microsatellite markers. *PLoS ONE* 15(3): e0230356.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 26. dubna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc - Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

L.S.

28-04-2021

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Šárka Grygarová**Název práce:** Genetické markery pro studium vnitrodruhové variability rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*)**Typ práce:** Bakalářská práce**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci**Vedoucí práce:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**Rok obhajoby práce:** 2022**Souhrn:**

Tato bakalářská práce je zaměřená na genetické markery rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*). Cílem práce bylo nalezení vysoce polymorfních a dobře hodnotitelných mikrosatelitů, které by byly vhodné pro kultivarovou determinaci u rakytníku řešetlákového.

Teoretická část se nejprve věnuje charakteristice čeledi hlošínovité, dále taxonomii a základní morfologii rakytníku řešetlákového, popisu květu, plodu, semene, kořenového systému a symbiotických bakterií rakytníku řešetlákového a geografickému rozšíření. V další kapitole jsou popsány významné obsahové látky v rakytníku. Dále je popsáno využití rakytníku řešetlákového. Poslední kapitola teoretické části se věnuje popisu genetických markerů s obecnou charakteristikou RAPD, AFLP, ISSR a SSR a jejich použití na rakytníku řešetlákovém.

Experimentální část se zabývá PCR amplifikací s použitím 48 párů primerů navržených pro rakytník řešetlákový. Tyto mikrosatelity byly testovány na 6 různých kultivarech rakytníku řešetlákového. Pomocí PCR amplifikace jsem potvrdila polymorfismus u 36 mikrosatelitů na odrůdách pěstovaných v rámci České republiky. Mikrosatelit Hr04 neposkytl žádný produkt. Mikrosatelity Hr01, Hr02 a Hr03 byly polymorfní, ale nehodnotitelné. Zbylých 8 mikrosatelitů poskytlo monomorfní produkt.

Klíčová slova: rakytník řešetlákový, *Hippophae rhamnoides*, mikrosatelity, hlošínovité**Počet stran:** 51**Počet příloh:** 0**Jazyk:** Český

Bibliographical identification:**Author's first name and surname:** Šárka Grygarová**Title:** Genetic markers for the study of intraspecific variability of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)**Type of thesis:** Bachelor thesis**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**The year of presentation:** 2022**Summary:**

The focus of this bachelor thesis is on the genetic markers of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). The goal of the thesis was a finding of highly polymorphic and feasibly evaluable microsatellites, which would be suitable for determination of cultivars of sea buckthorn.

The theory section is firstly characterizing the family of Elaeagnaceae, followed up by taxonomy and basic morphology of sea buckthorn - the description of the flower, the fruit, the seed, the root apparatus, and symbiotic bacteria of the plant, as well as its geographic distribution. In the next chapter there is an analysis of substances contained in sea buckthorn. Then there is a list of uses for sea buckthorn. The last part of the theory section is dedicated to description of genetic markers with a general characteristic of RAPD, AFLP, ISSR and SSR - and their applicability on sea buckthorn.

The experimental section of the thesis is about the PCR amplification by using 48 pairs of primers design for sea buckthorn. These microsatellites have been tested on six different cultivars of sea buckthorn. With the usage of PCR amplification, I have confirmed polymorphism for 36 microsatellites of different sea buckthorn cultivars grown in Czechia. Microsatellite Hr04 have not provided any products. Microsatellites Hr01, Hr02 and Hr03 have been found to be polymorphic, but not evaluable. Remaining eight microsatellites provided monomorphic products.

Keywords: sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, microsatellites, Elaeagnaceae**Number of pages:** 51**Number of appendices:** 0**Language:** Czech

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

V Olomouci dne:

.....

Šárka Grygarová

Zde bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za jeho rady, ochotný přístup, trpělivost, poskytnuté materiály, odborné vedení a čas, který mi věnoval po celou dobu zpracovávání teoretické a experimentální části mé bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala svému partnerovi a rodině za podporu během celého studia.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Cíle práce | 2 |
| 3 Literární přehled | 3 |
| 3.1 Hlošínovité | 3 |
| 3.2 Rakytník řešetlákový | 3 |
| 3.2.1 Taxonomie..... | 4 |
| 3.2.2 Základní morfologie | 4 |
| 3.2.6 Geografické rozšíření | 6 |
| 3.3 Obsahové látky rostlin rodu rakytník | 7 |
| 3.3.1 Organické kyseliny a cukry | 7 |
| 3.3.2 Flavonoidy..... | 8 |
| 3.3.3 Karotenoidy | 8 |
| 3.3.4 Aminokyseliny | 8 |
| 3.3.5 Mastné kyseliny..... | 9 |
| 3.3.6 Vitamín E | 9 |
| 3.4 Využití..... | 9 |
| 3.5 Genetické markery | 11 |
| 3.5.1 Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (RAPD) | 12 |
| 3.5.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)..... | 13 |
| 3.5.3 Inter simple sequence repeats (ISSR)..... | 13 |
| 3.5.4 Krátké tandemové repetice (SSR) neboli mikrosatelity | 13 |
| 4 Materiál a metody | 16 |
| 4.1 Biologický materiál | 16 |
| 4.2 Seznam použitých chemikálií..... | 16 |
| 4.3 Seznam použitých roztoků | 17 |
| 4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů..... | 20 |
| 4.5 Izolace DNA..... | 21 |
| 4.6 PCR amplifikace DNA rakytníku řešetlákového | 22 |
| 4.7 Amplifikované mikrosatelitní lokusy na DNA rakytníku řešetlákového | 23 |
| 4.8 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace..... | 23 |
| 5 Výsledky | 27 |
| 6 Diskuze | 37 |
| 7 Závěr | 42 |
| 8 Použitá literatura | 43 |

Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Plody rakytníku řešetlákového (převzato z Li <i>et al.</i> , 2002)..... | 5 |
| Obrázek 2: Geografické rozšíření rodu rakytníku (<i>Hippophae</i> L.) v Evropě a Asii (převzato z Lu, 1992)..... | 7 |
| Obrázek 3: Procentuální zastoupení počtu alel u mikrosatelitů. | 32 |
| Obrázek 4: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu SB 11 na šesti kultivarech rakytníku řešetlákového. | 35 |
| Obrázek 5: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu SB 13 na šesti kultivarech rakytníku řešetlákového. | 35 |
| Obrázek 6: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu SB 23 na šesti kultivarech rakytníku řešetlákového. | 36 |

Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka č. 1: Známé mikrosatelity pro čeleď hlošínovité. | 14 |
| Tabulka č. 2: Seznam použitých kultivarů rakytníku řešetlákového. | 16 |
| Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování). | 22 |
| Tabulka č. 4: Mikrosatelity testované v rámci této bakalářské práce na 6 kultivarech rakytníku řešetlákového. | 23 |
| Tabulka č. 5: Charakteristika 36 polymorfních a hodnotitelných lokusů, které byly testovány na 6 kultivarech rakytníku řešetlákového. | 29 |
| Tabulka č. 6: Genotypy 36 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 kultivarů rakytníku řešetlákového. | 33 |
| Tabulka č. 7: Srovnání mých výsledků testovaných na 6 jedincích s výsledky Jain <i>et al.</i> (2014). | 38 |
| Tabulka č. 8: Srovnání mých výsledků testovaných na 6 jedincích s výsledky Jain (2015). | 39 |
| Tabulka č. 9: Srovnání mých výsledků testovaných na 6 jedincích s výsledky Li <i>et al.</i> (2020). | 40 |

1 Úvod

Rakytník řešetlákový je velmi perspektivní ovoce, které se v České republice pěstuje zatím spíše hobby pěstiteli nebo na menších farmách. Ve světě, převážně v Číně, se jedná o hojně využívanou rostlinu pro lékařské, potravinářské i ekologické odvětví. Plody rakytníku obsahují vitamínově, nutričně a farmakologicky významné látky, a proto je rakytník řešetlákový někdy nazýván zázračnou rostlinou, superpotravinou nebo bankou vitamínů.

V rámci České republiky se pěstuje zhruba 50 kultivarů. Problémem je, že rakytník druhotně přes zoochorii (hlavně přenos ptáků) zplaňuje, a proto je přínosné mít paletu nástrojů (markerů) pro jednoznačné kultivarové přiřazení rostlin. Tato práce si klade za cíl otestovat 48 párů primerů, které poskytovaly polymorfni produkt při amplifikaci mikrosatelitů na rostlinách rakytníku řešetlákového pocházejících z Asie (konkrétně z Číny a Indie), a zjistit jejich variabilitu v rámci kultivarů pěstovaných v České republice.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace DNA vybraných kultivarů rakytníku řešetlákového s využitím primerů pro polymorfni mikrosatelity.

3 Literární přehled

3.1 Hlošínovité

Hlošínovité (Elaeagnaceae) je čeleď rostlin z řádu růžotvaré (Rosales). Do této čeledi patří 3 rody, a to rakytník, hlošina a šeferdie (Christenhusz *et* Byng, 2016). Taxonomie není zcela zpracovaná, jelikož zástupci čeledi hlošínovité často rostou v nepřístupných velehorských oblastech Asie, ale uvádí se, že rod hlošina má 50–70 druhů, rod šeferdie má 3 druhy a rod rakytník má 7 druhů. Čísla jsou nepřesná, protože se v některých případech diskutuje, zdali se jedná o poddruh či samostatný druh.

Jsou to stromy či keře, které mohou být opadavé nebo stálezelené. Někteří zástupci mohou mít trnité větve. Mají jednoduché listy, které jsou často pokryty stříbřitě hnědými drobnými šupinami či chloupky. Zástupci této čeledi jsou jednodomé i dvoudomé rostliny. Plod připomíná peckovici, ale je to nažka nebo oříšek obalený zdužnatělou češulí. U mnoha druhů jsou tyto plody jedlé a obsahují velké množství farmakologicky významných látek. Některé druhy jsou naopak pěstovány jako okrasné dřeviny pro své nápadné stříbřité olistění či výrazné oranžové až červené plody.

V Evropě je čeleď zastoupena hlošínou úzkolistou a rakytníkem řešetlákovým, rovněž jsou pěstovány v České republice, avšak zde nejsou původní. Čeleď se přirozeně vyskytuje v severním mírném pásu Ameriky a Eurasie, přesahuje až na jih tropické Asie a Austrálie. Většina druhů se nachází na suchých stanovištích a některé druhy dokonce tolerují vysokou úroveň slanosti půdy (Baker, 1992; Slavík, 1997; Swenson *et* Bartish, 2002; Watson *et* Dallwitz, 2015).

3.2 Rakytník řešetlákový

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides* L.) je dřevina z čeledi hlošínovitých (Rousi, 1971). Rodové jméno pochází z řeckých slov *hippo*, což znamená kůň a *phaos*, což znamená zářit. Význam těchto slov sahá až do starověkého Řecka, kde používali listy rakytníku jako krmivo pro koně, aby se jejich srst více leskla (Lu, 1992). Kromě listů mají svůj význam také plody rakytníku, které se po staletí používají v Asii i Evropě pro potravinářské, terapeutické a farmaceutické účely (Bailey *et* Bailey, 1978).

3.2.1 Taxonomie

Rousi (1965) referoval o počtu chromozomů v 32 vzorcích semen rakytníku řešetlákového odebraných z různých lokalit v Evropě a Asii. Všechny tyto vzorky měly stejný počet chromozomů, a to $2n = 24$. Později Rousi (1971) rozdělil rakytník řešetlákový do 9 poddruhů: *H. rhamnoides carpatica*, *caucasica*, *fluviatilis*, *gyantsensis*, *mongolica*, *rhamnoides*, *sinensis*, *turkestanica* a *yunnanensis*. Rozdíly mezi těmito poddruhy jsou především ve velikosti, tvaru a počtu postranních žilek na listech a počtu a barvě chloupků. Lian (1988) představil nový klasifikační systém pro rod rakytník, kdy poddruh *H. rhamnoides gyantsensis* určil jako samostatný druh, a tak podle něj má rakytník řešetlákový pouze 8 poddruhů.

3.2.2 Základní morfologie

Rakytník řešetlákový je opadavý, ostnatý keř nebo strom pokrytý stříbřitými šupinami. Obvykle dosahuje 2–4 metry na výšku (Li, 2003). Nicméně výška rakytníku úzce souvisí s vlastnostmi společenstva, ve kterém roste. Například rakytník rostoucí v severních nebo severovýchodních horských oblastech Číny dosahuje výšky 1–5 metrů, zatímco rakytník, který roste v lesních oblastech s dostatkem vody (např. na březích řek), může dorůst do výšky 15–18 metrů (Lu, 1992). Rakytník snáší nízké teploty do $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lu, 1992), vysoké pH půdy do 8,0 a sůl z mořské vody v pobřežních oblastech (Bond, 1983). Jeho přirozená délka života je minimálně 60–70 let (Lu, 1992). Má hnědou nebo černou drsnou kůru a hustou šedozelenou korunu (Li *et* Schroeder, 1996). Listy jsou malé (obvykle 3–8 cm dlouhé a 0,4–1,0 cm široké), střídavé, úzké a kopinaté a na zadní straně jsou pokryty stříbřitými hvězdicovitými šupinami, které odrážejí sluneční svit, a tím snižují ztrátu vody z rostliny (Lu, 1992). Vrchní strana listů je stříbrošedá (Li *et* Schroeder, 1996).

Rakytník řešetlákový se řadí mezi dvoudomé rostliny, což znamená, že samčí a samičí květy vyrůstají na různých rostlinách rakytníku. Pohlaví rakytníku nelze určit, dokud nezačne kvést (Li *et* Schroeder, 1996). K prvnímu kvetení většinou dochází na tříleté rostlině (Bernath *et* Foldesi, 1992). Květy rakytníku jsou nenápadné a apetalní (Li, 2003). Samčí květenství je tvořeno 4–6 květy. Samčí rostliny produkují pyl, který je uvolňován ve velkém množství, pokud teplota vzduchu dosáhne 6–10 $^{\circ}\text{C}$. Samičí květenství se obvykle skládá z jednoho jediného květu s jedním vaječným a jedním vajíčkem. Samičí rostlina produkuje plody se semeny. Rostlina rakytníku je při opylení

zcela závislá na větru, jelikož samčí ani samičí květy neobsahují nektar, a proto nemohou přilákat včely ani jiný hmyz (Lu, 1992; Li *et* Schroeder, 1996).

Plod rakytníku je kombinací nerozdělené, masité a rozšířené kalichové trubice a vaječníku (Lu, 1992). Plod je přibližně 5–10 mm velký a 3–5 mm široký. Tvar plodů je oválný až kulatý. Plody mají krátkou stopku a rostou stěsnané vedle sebe na větvích. Mladé plody jsou tvrdé a nazelenalé, zráním však měknou a mění barvu do žluta až do tmavě oranžova (viz Obrázek 1). Plody zrají od srpna až do září (Valíček *et* Havelka, 2008). Rakytník udrží zralé plody několik měsíců, což dává dostatek času na jejich sklizeň (Lu, 1992). Chuť plodů je kyselá až nasládlá (Valíček *et* Havelka, 2008).

Semeno je vejčité podlouhlé o délce 4–7 mm, šířce 2,5–3,5 mm a tloušťce 1,6–2,2 mm. Slupka semene je šedohnědá nebo tmavě hnědá, kožovitá a lesklá (Lu, 1992).



Obrázek 1: Plody rakytníku řešetlákového (převzato z Li *et al.*, 2002)

Rakytník řešetlákový má velmi silný kořenový systém, díky kterému dokáže odsát více vody a živin než jiné rostliny. Pětiletá rostlina má kulový kořen, který má 3 m a horizontální kořeny, které mají 6–10 m. Kořeny rakytníku jsou také schopny přeměnit nerozpustné organické a minerální látky v půdě na rozpustnější formy (Lu, 1992). Rostlina rychle kolonizuje okolí svými kořenovými výmladky (Li *et* Schroeder, 1996).

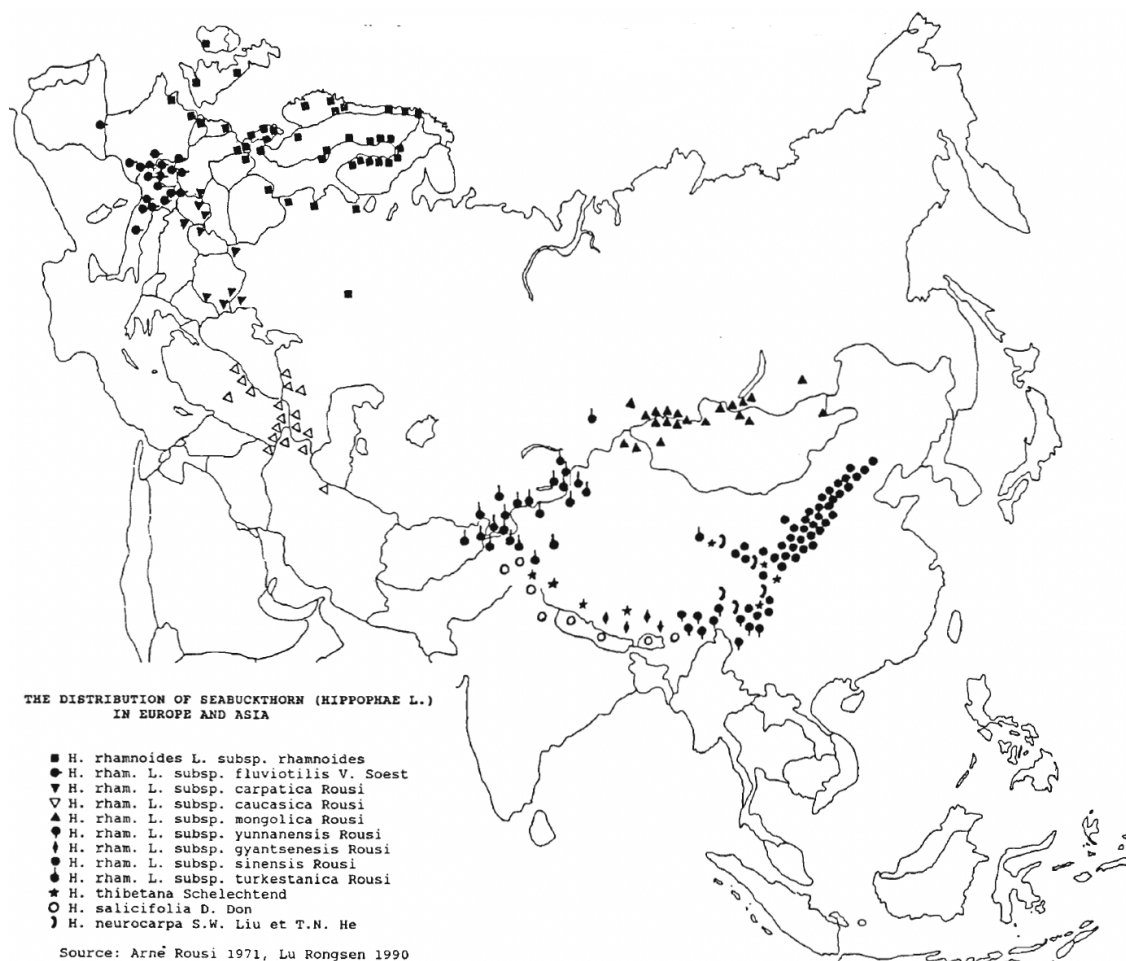
Na kořenech rakytníku byly nalezeny symbiotické bakterie rodu *Frankia*. Tato symbióza mezi bakterií a rakytníkem má za následek tvorbu kořenových uzlů, které

mohou fixovat maximální množství vzdušného dusíku. Odhaduje se, že schopnost kořenů rakytníků vázat dusík je dvakrát větší než u čeledi bobovité (Fabaceae) (Lu, 1992).

3.2.6 Geografické rozšíření

Rakytník se přirozeně vyskytuje v mírném pásmu mezi 27–69° severní šířky a 7° západní až 122° východní délky. Původně pochází z himálajských horských oblastí a odtud se rozšířil do jihozápadní, severozápadní a severní Číny a Mongolska. Dále se rozšířil do severozápadní oblasti Eurasie až na severozápadní břeh Skandinávského poloostrova. V Asii se dále rozrostl do jižní Sibíře v Ruské federaci a také do Indie, Nepálu, Pákistánu, Afganistánu a dalších zemí (viz Obrázek 2) (Rousi, 1971; Pan *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1989; Lu, 1990). Nikolić a Topić (2005) označují tento druh jako regionálně vyhynulý taxon v Chorvatsku.

Co se týče České republiky, zde je rakytník řešetlákový často vysazován v parcích, zahradách, na sídlištích a podél silnic. Nejhojněji se vysazuje ve východních Čechách a na jižní Moravě. V Čechách byl poprvé vysazen roku 1835 v Praze v Královské oboře (Slavík *et al.*, 1997)



Obrázek 2: Geografické rozšíření rodu rakytníku (*Hippophae* L.) v Evropě a Asii (převzato z Lu, 1992)

3.3 Obsahové látky rostlin rodu rakytník

Plody rakytníku jsou velmi bohaté na cukry, bílkoviny, organické kyseliny, aminokyseliny a vitamíny (Benanth *et* Foldesi, 1992). Obsah těchto složek se liší podle zralosti a velikosti plodů, odrůdy rakytníku a zeměpisné polohy (Bounous *et* Zanini, 1988; Wang, 1990; Chen *et al*, 1991; Lu, 1992). Eliseev (1976) uvedl, že hladiny biologických aktivních látek, jako je kyselina askorbová a karoten, byly vyšší ve stromovitých formách rakytníku řešetlákového než ve formách keřových.

3.3.1 Organické kyseliny a cukry

Plody rakytníku řešetlákového obsahují organické kyseliny a cukry. Podle studií plně zralé plody rakytníku obsahují 3,1–3,6 g organických kyselin na 100 g plodů (Arimboor *et al.*, 2006). Nejvýznamnější organickou kyselinou v plodech rakytníku je vitamín C (kyselina L-askorbová). Čerstvé plody rakytníku obsahují přibližně 0,4–2,5 g vitamínu C na 100 g plodů, což je mnohem více ve srovnání s běžně

konzumovaným ovocem, jako je např.: pomeranč (50 mg/100 g), jahody (64 mg/100 g) nebo kiwi (100–400 mg/100 g) (Li, 2003). Plody rakytníku tedy patří mezi nejbohatší ovoce na vitamín C (Li *et al.*, 1996; Gutzeit *et al.*, 2008). Další významné organické kyseliny v plodech jsou kyselina jablečná (1940–4600 mg/100 g), kyselina chinová (810–2820 mg/100 g) a kyselina citrónová (90–160 mg/100 g) (Raffo *et al.*, 2004). Avšak různé studie ukázaly, že ruské odrůdy rakytníku mají celkovou kyselost nízkou, finské odrůdy mají střední kyselost a nejvyšší kyselost vykazovaly čínské odrůdy (Ma *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1989; Kallio *et al.*, 1999).

Obsah cukrů v rakytníkové šťávě je 2,7–5,3 g/100 ml. Plody rakytníku obsahují především glukózu, fruktózu a xylózu (Zheng *et al.*, 2012; Krejcarová *et al.*, 2015).

3.3.2 Flavonoidy

Plody rakytníku jsou bohaté na flavonoidy včetně flavonolů, katechinů a leukoanthokyanidinů (Barl *et al.*, 2003). Z plodů bylo izolováno přes 20 flavonoidů (Chu *et al.*, 2003). Obsah flavonoidů v listech a plodech se pohybuje od 310 do 2100 mg na 100 g sušených listů a 120–1000 mg na 100 g zralých plodů (Chen *et al.*, 1991; Glazunova *et al.*, 1984, 1985). Hlavními flavonoidy v plodech rakytníku jsou kvercetin (3–10 mg/100 g), isorhamnetin (35–66 mg/100 g) a kempferol (0,3–0,5 mg/100 g) (Raffo *et al.*, 2004; Zeb, 2004; Krejcarová *et al.*, 2015).

3.3.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou další skupinou bioaktivních látek v plodech rakytníku. Jsou to klíčové sloučeniny, které přispívají ke žluté až oranžové barvě plodů (Mendelová *et al.*, 2016). V různých kultivarech rakytníku bylo celkem identifikováno 41 karotenoidů (Bekker *et al.*, 2001). Na základě studie se čtyřmi kultivary s různou dobou sklizně je celkový obsah karotenoidů v čerstvých plodech 15–185 mg/100 g (Andersson *et al.*, 2009). Tři hlavní karotenoidy v rakytníku jsou zeaxantin, β -karoten a β -kryptoxantin (Raffo *et al.*, 2004). Rakytníkový olej z dužiny plodů obsahuje vyšší koncentraci karotenoidů ve srovnání s čerstvými plody (Ranjith *et al.*, 2006).

3.3.4 Aminokyseliny

Šťáva z plodů je rovněž bohatá na různé aminokyseliny. Analýza prováděná na ruských kultivarech odhalila, že plody rakytníku obsahují 17 aminokyselin, které jsou

u člověka proteinogenní, včetně 7 esenciálních (lysin, fenylalanin, leucin, izoleucin, methionin, valin a threonin) (Teleszko *et al.*, 2015). Je uváděno, že obsah esenciálních aminokyselin v plodech rakytníku tvoří 42–46 % z celkového obsahu aminokyselin. Lze tedy konstatovat, že rakytník řešetlákový je cenným přírodním zdrojem obsahujícím důležité bílkoviny (Yushipitsina *et al.*, 1988).

3.3.5 Mastné kyseliny

V čerstvých plodech rakytníku jsou obsažena 3 % lipidů (Arimboor *et al.*, 2006). Složení mastných kyselin v rakytníkovém oleji je zcela unikátní. Například kyselina palmitoolejová, která je velice vzácná v rostlinných zdrojích, je nejhojnější mastnou kyselinou v rozmezí od 32 do 52 % v rakytníkovém oleji z dužiny plodů (Ranjith *et al.*, 2006). Dalšími hlavními mastnými kyselinami jsou kyselina palmitová (26–36 %), kyselina olejová (10–26 %), kyselina linolová (5–16 %) a kyselina linolenová (6 %) (Ranjith *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2008).

Olej ze semen rakytníku také obsahuje kyselinu palmitovou, olejovou, linolovou a linolenovou. Avšak poměr volných mastných kyselin a bioaktivních látek přítomných v oleji ze semen rakytníku je zcela odlišný od poměru v oleji z dužiny plodů. Jedním z klíčových atributů oleje ze semen rakytníku je, že v rakytníkovém oleji ze semen je blízký poměr 1:1 kyseliny linolové a linolenové, což je u rostlin unikátní (Yang *et Kallio*, 2002; Cenkowski *et al.*, 2006; Krejcarová *et al.*, 2015).

3.3.6 Vitamín E

V rakytníkovém oleji z dužiny plodů jsou přítomny všechny přírodní izomery vitamínu E (Erkkola *et Yang*, 2003). Nejzastoupenější izomer vitamínu E v rakytníkovém oleji z dužiny plodů je α -tokoferol, který tvoří 40–60 % obsahu celkových izomerů. Rakytníkový olej z dužiny plodů obsahuje přibližně 67–179 mg vitamínu E na 100 g oleje (Ranjith *et al.*, 2006). Lu (1992) uvedl, že obsah vitamínu E v plodech rakytníku je přibližně 200 mg/100 g plodů.

3.4 Využití

Rakytník řešetlákový se využívá k mnoha účelům a má značný ekonomický potenciál. Plody se používají již od starověku v Evropě a Asii jako zdraví prospěšné potraviny, léčiva a přípravky na pleť (Li *et Schroeder*, 1996). V současné době rakytník

řešetlákový přitahuje značnou pozornost výzkumníků z celého světa především pro svou nutriční a léčivou hodnotu (Bawa *et al.*, 2002).

Rakytník řešetlákový je ekologicky významnou rostlinou. Díky nitrogenním bakteriím na kořenech rakytníku tyto dřeviny dokáží růst na nehostinných místech a také jsou užitečné pro rekultivaci půdy (Gatner *et Gardner*, 1970). 8–10 let starý rakytníkový porost dokáže vázat 180 kg dusíku/ha/rok (Lu, 1992). Dále se rakytník používá v produkci biomasy, šestiletý porost může vyprodukovat 18 tun palivového dřeva. Rakytník je odolný vůči suchu a snáší zasolenou půdu a nízké teploty, a proto může růst na lokalitách, které jsou pro jiné rostliny nehostinné. Rakytník je vysazován na březích řek a jezer, na strmých svazích apod. Významné jsou také větrolamy z rakytníku, které jsou účinné při prevenci větrné eroze na otevřených plochách. Ekologický význam rakytníku také tkví ve snižování znečištění ovzduší. Pro svou odolnost vůči škůdcům má menší spotřebu pesticidů, které jsou potenciálně škodlivé pro životní prostředí. V některých zemích je vysazován podél silnic, kde posypová sůl brání růstu mnoha dalších dřevin. Rakytník tak pomáhá předcházet erozi a uvolňování znečišťujících látek ze silnic (Lu, 1992; Jasra, 1998; Small *et al.*, 2000; Singh *et Moersel*, 2005).

V současné době mnoho firem vyrábí rakytníkové potraviny, nápoje a další produkty, jako jsou džemy, želé, džusy a sirupy. K tradičním výrobkům přibýly různé novinky jako rakytníkový kondenzovaný džus, kandované ovoce nebo rakytníkový „sýr“. Dokonce byly vyrobeny rakytníkové bonbony, máslo z rakytníku a čaj (Lu, 1992; Tiitinen *et al.*, 2005).

Rakytník může být využíván také jako krmivo pro zvířata. Listy a jemné větve rakytníku obsahují mnoho živin a bioaktivních látek, a proto jsou velmi dobrým doplňkovým krmivem pro ovce, kozy a skot (Morar *et al.*, 1990; Li *et Schroeder*, 1996).

Pigmenty rakytníku jsou široce využívány jako potravinářské přísady. Pigment nazývaný „rakytníková žlutá“ („seabuckthorn yellow“) se skládá z karotenu a vitamínu E. Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je vzhled, rozpustnost, barevná hodnota, tepelná a světelná stabilita, z něj činí velmi užitečnou potravinovou přísadu (Liu *et Liu.*, 1989; Chen *et al.*, 1995).

Léčivé účinky rakytníku jsou dobře zdokumentovány v Asii a v Evropě. Klinické výzkumy lékařského využití byly zahájeny v Rusku během 50. let 20. století (Gurevič, 1956). Rakytníkový olej je schválen pro klinické použití v nemocnicích v Rusku a Číně, kde byl oficiálně uveden v lékopisu v roce 1977 (Xu, 1994). Více než 10 různých léků bylo vyvinuto z rakytníku a jsou dostupné v různých formách (např. jako tekutiny,

prášky, náplasti, pasty, masti, čípky atd.) a lze je použít k léčbě mnoha nemocí (např.: záněty sliznic, poškození ozářením, popáleniny, opařeniny, žaludeční vředy, omrzliny apod.) (Abartene *et* Malakhovskis, 1975; Kukenov *et al.*, 1982; Dai *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 1990; Buhatel *et al.*, 1991; Chen, 1991). Nejdůležitější farmakologické účinky rakytníkového oleje jsou zmírnění zánětu, zmírnění bolesti a podpora regenerace tkání (Li *et* Schroeder, 1996). Rovněž bylo prokázáno, že rakytník má silnou antioxidační aktivitu díky vysokému obsahu flavonoidů a vitamínu C (Rosch, 2004). Na základě výzkumů se předpokládá, že díky antioxidačním vlastnostem rakytník může mít chemopreventivní a protinádorovou účinnost. Další výzkumy ukázaly, že složky přítomné v plodech rakytníku vykazují radioprotekci pomocí několika mechanismů, jako je vychytávání volných radikálů, chelace kovů, zhutňování chromatinu a indukce hypoxie (Goel *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2003).

Na základě mnoha lékařských studií zabývajících se testy na kůži, bylo prokázáno, že výtažky z rakytníku mohou účinně zlepšit mikrocirkulaci krevních kapilár a vyživovat pokožku a vlasy. Klinické účinky rakytníkového extraktu byly pozorovány u 350 pacientů a výsledky ukázaly, že rakytníkový kosmetický krém měl pozitivní terapeutické účinky na řadu kožních onemocnění (např.: melanózu, stařecké kožní vrásky, akné na obličeji atd.) (Lu, 1992).

Olej ze semen rakytníku díky svému obsahu nenasycených mastných kyselin je slibný pro svou absorpci světla a změkčující vlastnosti jako přísada do kosmetických přípravků, převážně do přípravků na ochranu pokožky před UV zářením. Olej ze semen silně absorbuje v rozsahu UV-B (290–320 nm), a proto může být používán jako přírodní ochranný krém proti slunečním paprskům (Beveridge *et al.*, 1999).

3.5 Genetické markery

Genetický marker je sekvence DNA, která je použitelná například pro popis genetických rozdílů mezi jednotlivými druhy či organismy a obecně fungují jako „znaky“ (Collard *et al.*, 2005). Genetické markery používané v genetice a šlechtění rostlin jsou rozděleny do dvou základních skupin: klasické markery a DNA/molekulární markery (Xu, 2010). Příkladem klasických markerů jsou morfologické, cytologické a biochemické markery. DNA markery jsou definovány jako krátké sekvence DNA vykazující polymorfismus mezi různými jedinci. Vznikají z různých typů mutací jako jsou substituční mutace (bodové mutace), inserce či delece (Paterson, 1996). Oproti klasickým

markerům je počet DNA markerů prakticky neomezený (Winter *et Kahl*, 1995). DNA markery mohou být rozděleny do tří skupin na základě způsobu jejich identifikace, a to DNA markery založené na hybridizaci, na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo na bázi sekvenování DNA (Winter *et Kahl*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 1999; Joshi *et al.*, 1999). DNA markery mohou odhalit genetické rozdíly, které lze zachytit například pomocí PCR amplifikace s následnou gelovou elektroforézou a vizualizací chemikáliemi (ethidium bromid nebo stříbro) nebo radioaktivními či chemickými sondami. DNA markery jsou užitečné, pokud odhalují rozdíly mezi jedinci stejného či odlišného druhu, tyto markery se nazývají polymorfní markery (Collard *et al.*, 2005).

Genetické markery jsou důležitým nástrojem v oblasti šlechtění rostlin. Mezi techniky, které byly nebo jsou používány pro aplikaci ve šlechtění rostlin, patří polymorfismus délký restrikčních fragmentů (RFLP), polymorfismus délký amplifikovaných fragmentů (AFLP), náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD), mikrosatelity nebo krátké tandemové repetice (SSR) a jednonukleotidový polymorfismus (SNP) (Gupta *et al.*, 2001; Jiang, 2013).

3.5.1 Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD)

RAPD markery se nejčastěji využívaly ke studiu genetické diverzity, když nebyly k dispozici žádné sekvenční informace o zkoumaném organismu. Jednalo se o markerový systém založený na PCR. Využíval se jediný, krátký (obvykle 10 bp dlouhý) a náhodný primer. Primer, který se vázal na mnoho různých lokusů, se používal k amplifikaci náhodných sekvencí z templátu DNA (Williams *et al.*, 1990).

Lācis *et Kota-Dombrovska* (2014) ve své práci použili RAPD a SSR markery. Cílem jejich studie bylo porovnat využití RAPD a SSR markerů při charakterizaci genetické diverzity rakytníku řešetlákového pěstovaného v Lotyšsku. Zjistili, že tyto dvě metody molekulárních markerů se vzájemně doplňovaly a poskytly genetické informace pro lotyšské pěstitele rakytníku řešetlákového. Použité molekulární markery potvrdily, že populace rakytníků pěstovaných v Lotyšsku má vysokou genetickou diverzitu. Aplikované RAPD markery vykazovaly vysokou úroveň polymorfismu a jsou vhodné pro aplikaci u různých poddruhů rakytníku řešetlákového. Avšak Lācis *et Kota-Dombrovska* (2014) referovali, že ke komplexnímu hodnocení rostlinného materiálu rakytníku by měla být provedena analýza pomocí obou markerů (RAPD i SSR), jelikož SSR markery jsou specifitější a zajišťují vyšší opakovatelnost a transformovatelnost dat.

3.5.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)

AFLP je metoda založená na PCR využívající restriční enzymy ke štěpení genomové DNA s následnou ligací adapterů na lepidivé konce restričních fragmentů. Poté je vybrána podskupina restričních fragmentů, které mají být amplifikovány. K této selekci slouží primery komplementární k sekvenci adapterů, sekvenci restričního místa a několika nukleotidům uvnitř fragmentů restričního místa (Vos *et al.*, 1995).

Ruan *et Li* (2005) ve své studii použili AFLP fingerprinting analýzu na 15 kultivarech rakytníku řešetlákového. Devět odrůd *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* pocházelo z Ruska a Mongolska, tři odrůdy *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* pocházely z Číny a tři hybridní odrůdy pocházely také z Číny. Analýza AFLP byla provedena pomocí Analysis System II (GIBCO-BRL Life Technologies) podle protokolu výrobce. Na základě AFLP fingerprinting analýzy Ruan *et Li* (2005) dokázali všech 15 kultivarů jednoznačně geneticky rozlišit.

3.5.3 Inter simple sequence repeats (ISSR)

Podobně jako RAPD, ani ISSR nevyžaduje žádnou předchozí znalost sekvence cílových oblastí (Godwin *et al.*, 1997). ISSR je markerový systém, který umožňuje amplifikaci oblastí mezi dvěma inverzně orientovanými repeticemi mikrosatelitů. K vytvoření řady amplikonů se většinou používá jeden primer.

ISSR markery použili Tian *et al.* (2004) pro výzkum genetické diversity v populacích rakytníku řešetlákového rostoucích v severovýchodní a severozápadní Číně. Ve své práci použili 11 populací rakytníku řešetlákového z lokalit v Číně, kdy 8 populací bylo z provincie Liaoning a 3 populace z provincie Gansu. V populacích v každé lokalitě bylo náhodně vybráno 20 jedinců. Celkem ve své studii použili 220 vzorků. Došli k závěru, že geografické vzdálenosti nemají nejspíše žádný vliv na genetickou diferenciaci a že pro lepší porozumění genetické diverzity rakytníku na úrovni populací jsou zapotřebí další srovnávací studie.

3.5.4 Krátké tandemové repetice (SSR) neboli mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemové repetice 1–6 bp dlouhých motivů, které jsou náhodně rozmístěné v celém genomu všech živých organismů (Tautz, 1989). Nejčastější příčinou délkové variability mikrosatelitů je skluz polymerázy na místech opakujících se nukleotidových motivů (Ellegren, 2004). Mikrosatelity mají vysokou úroveň

polymorfismu, která je způsobena výskytem různého počtu repetice v oblastech mikrosatelitů a lze ji snadno detekovat pomocí PCR (Zane *et al.*, 2002; Kalia *et al.*, 2011). Výskyt mikrosatelitů může být způsoben skluzem jednořetězcové DNA, rekombinací dvouřetězcové DNA či přenosem mobilních elementů (transpozonů). Běžné motivy přítomné v mikrosatelitech jsou mono (A nebo T), di (AT nebo GA), tri (AGG) nebo tetra (AAAC). Sekvence, které ohraničují mikrosatelity, jsou konzervované a používají se při návrhu primerů (Kalia *et al.*, 2011). Mikrosatelity jsou markery s vysokou vypovídající hodnotou, jsou rozptýleny po celém genomu, reprodukovatelné, vysoce polymorfní s kodominantním způsobem dědičnosti, a proto jsou tyto markery hojně využívány při studiích (Tautz, 1989; Kalia *et al.*, 2011).

Přestože se jedná o velmi užitečné markery, nebylo navrženo mnoho mikrosatelitních markerů pro čeleď hlošínovité. V rámci této čeledi jsou známé mikrosatelity pro zástupce z rodu rakytník a hlošina (viz Tabulka č. 1). Ve své bakalářské práci se budu podrobněji věnovat studiu mikrosatelitů z publikací Wang *et al.* (2008), Jain *et al.* (2014) a Li *et al.* (2020). Také budu testovat mikrosatelity z publikace Jain (2015), avšak v této studii bylo popsáno více mikrosatelitů a já se budu věnovat pouze USSM mikrosatelitům.

Tabulka č. 1: Známé mikrosatelity pro čeleď hlošínovité.

| Druhy, podruhy | Počet mikrosatelitů | Literární zdroj |
|---|---------------------|------------------------------|
| <i>H. rhamnoides</i> ssp. <i>sinensis</i> | 9 | Wang <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>H. rhamnoides</i> , <i>H. salicifolia</i> | 11 | Jain <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>H. rhamnoides</i> | 34 | Jain, 2015 |
| <i>H. rhamnoides</i> ssp. <i>mongolica</i> , <i>H. rhamnoides</i> ssp. <i>sinensis</i> , hybridy (<i>H. r.</i> ssp. <i>mongolica</i> x <i>H. r.</i> ssp. <i>sinensis</i>) | 23 | Li <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>H. rhamnoides</i> | 14 | Islam <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>H. tibetana</i> | 8 | Qiong <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>H. rhamnoides</i> | 11 | Jain <i>et al.</i> (2010) |
| <i>H. rhamnoides</i> | 8 | Srihari <i>et al.</i> (2013) |
| <i>E. angustifolia</i> | 11 | Gaskin <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>E. mollis</i> | 20 | Ye <i>et al.</i> (2016) |

První, kdo publikovali mikrosatelity pro rakytník řešetlákový, byli Wang *et al.* (2008), kteří navrhli devět polymorfních markerů rozlišujících 3–12 alel na lokus. Mikrosatelity otestovali nejprve na 12 jedincích *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*. Dále těmito polymorfními mikrosatelity provedli *cross-species* amplifikaci u podruhu *H. rhamnoides* ssp. *turkestanica*, kdy bylo úspěšně polymorfních jen 8 mikrosatelitů. A dále na dalších 3 druzích (*H. gyantsensi*, *H. neurocarpa* a *H. goniocarpa*) bylo polymorfních pouze 7 z 9 mikrosatelitů. Variabilní mikrosatelitní lokusy izolované v této studii jsou první sadou molekulárních markerů navržených speciálně pro *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*.

Jain *et al.* (2014) ve své studii použili nástroj pro vyhledávání mikrosatelitů (MISA). K ověření domnělých mikrosatelitových markerů použili 18 jedinců *H. rhamnoides* odebraných z přirozené populace z Lehu (Indie) a 5 jedinců *H. salicifolia* odebraných z areálu DIHAR v Lehu. Z 25 párů primerů navržených pro amplifikaci lokusů mikrosatelitové sekvence 21 párů úspěšně amplifikovalo cílové lokusy ve všech vzorcích *H. rhamnoides* a také došlo k úspěšné *cross-species* amplifikaci u všech vzorků *H. salicifolia*. Z 21 párů primerů, které poskytly PCR produkt, bylo 11 polymorfních u *H. rhamnoides*. Detekováno bylo 2 až 7 alel.

Li *et al.* (2020) ve své práci navrhli 23 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů a otestovali je na 52 jedincích *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, 6 jedincích *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* a na 20 hybridech (*H. r.* ssp. *mongolica* x *H. r.* ssp. *sinensis*). 76 jedinců bylo z výzkumného institutu v Číně. Další 2 přírůstky byly sklizeny z obdělávaných polí v Qinghe a Datong, kdy tyto oblasti mají různé geografické a klimatické podmínky. Celkem testovali 23 párů primerů, kdy všechny byly polymorfní. Výsledky ukázaly, že všechny jedince lze rozdělit do dvou skupin (I a II). Jedinci *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* byly zařazeny do skupiny I. Tito jedinci měli, navzdory velkým geografickým rozdílům, úzké příbuzné vztahy. Druhá skupina byla rozdělena do 3 podskupin (IIa, IIb, IIc). 20 hybridních jedinců bylo zařazeno do skupiny IIa. Podskupiny IIb a IIc obsahovaly všechny jedince *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* (kteří byli do výzkumného institutu v Číně dovezeni z Ruska a Mongolska). Studie prokázala, že vztah mezi ssp. *mongolica* a ssp. *sinensis* je poměrně vzdálený. Hybridi měli bližší vztah k ssp. *mongolica*, nejspíše kvůli tomu, že samičí rodič byl právě ssp. *mongolica*.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro analýzu pocházel ze šesti různých kultivarů rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*). Konkrétně se jednalo o kultivary Pollmix, Frugana, Tarmo, Altajská, Podruga a Botanika (viz Tabulka č. 2). Jednotlivé odebrané vzorky listů byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího použití (do izolace DNA). Z odebraných vzorků listů byla vyizolovaná genomická DNA, která byla rozpuštěna v TE pufru a koncentrace se pohybovala v rozmezí 5–10 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka č. 2: Seznam použitých kultivarů rakytníku řešetlákového.

| Číslo vzorku | Kultivar | Pohlaví |
|--------------|----------|---------|
| 1 | Pollmix | Samčí |
| 2 | Frugana | Samičí |
| 3 | Tarmo | Samčí |
| 4 | Altajská | Samičí |
| 5 | Podruga | Samičí |
| 6 | Botanika | Samičí |

4.2 Seznam použitých chemikálií

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza ($5\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) (Roth)
- Deionizovaná voda
- dNTPs ($100\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $400\text{ }\mu\text{l}$ každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)

- Chlorid draselný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachner)
- Chloroform (Lachner)
- Isoamylalkohol (IAA) (Lachner)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Močovina (Lachner)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (AppliChem)
- N,N'-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- Octan sodný (Lachema)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP 40) (Fluka)
- Rain off - tekuté stěrače (Sheron)
- Tekutý dusík (Linde)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Triton X-100 (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)
- β-merkptoethanol (Serva)

4.3 Seznam použitých roztoků

- Akrylamid, 6% zásobní roztok:
 - 420 g močoviny
 - 484 ml deionizované vody
 - 50 ml 10x TBE
 - 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu:N,N'-methylbisakrylamidu 19:1
 - všechny složky rozpustit, zfiltrvat a uložit do chladničky v tmavé láhvi
- Akrylamid:N,N'-methylenbisakrylamid 19:1, 40% zásobní roztok:
 - 380 g akrylamidu
 - 20 g N,N'-methylenbisakrylamidu
 - rozpustit v 500 ml deionizované vody

- objem doplnit do 1000 ml
- roztok uložit v temné láhvi ve 4 °C
- CTAB extrakční pufr:
 - 5 g CTAB
 - 25 ml Tris o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,0
 - 10 ml Na_2EDTA o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,0
 - 20,45 g NaCl
 - 2,5 g PVP 40
 - objem doplnit do 250 ml deionizovanou vodou
 - před použitím přidat 30 μl β -merkaptoethanolu
- Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:
 - 0,8 g AgNO_3
 - 800 ml deionizované vody
 - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
- Fix/stop roztok:
 - 80 ml ledové kyseliny octové
 - 800 ml deionizované vody
- Hydroxid sodný o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$:
 - 40 g hydroxidu sodného
 - doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- Chloroform:IAA, 24:1:
 - 192 ml chloroformu
 - 8 ml isoamylalkoholu
- Kyselina dusičná, 1% roztok:
 - 12 ml 65% kyseliny dusičné
 - 800 ml deionizované vody
- MgCl_2 pro *aTaq* polymerázu, $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$:
 - 90 ml deionizované vody
 - 0,508 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - po rozpuštění doplnit na 100 ml
- Na_2EDTA , $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zásobní roztok:
 - 186,12 g dihydrátu ethylendiaminotetraoctanu sodného $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - rozpustit v 800 ml deionizované vody

- upravit pH na hodnotu 8,0 pomocí pevného NaOH
- objem doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml
- Nanášecí pufr pro elektroforézu v PAA gelu:
 - 25 ml deionizované vody
 - 100 ml formamidu
 - 0,125 g bromfenolové modře
 - 0,125 g xylenové modře
- Octan sodný, 3 mol·l⁻¹:
 - 81,65 g octanu sodného
 - rozpustit ve 200 ml deionizované vody
 - pH upravit pomocí ledové kyseliny octové na hodnotu 5,2
- Peroxodisíran amonný, 10% roztok:
 - 1 g peroxodisíranu amonného
 - 10 ml deionizované vody
 - uchovávat v chladničce
- Polyakrylamidový gel, 6% roztok:
 - 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
 - 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈
 - 40 µl N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu
- Reaction buffer pro aTaq DNA polymerázu, 10x:
 - 80 ml deionizované vody
 - 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
 - pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0
 - 3,73 g KCl
 - 1 ml Triton X-100
 - po rozpuštění doplnit na 100 ml
- Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:
 - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
 - 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- TBE pufr, 10x zásobní roztok:
 - 55 g kyseliny borité
 - 108 g trishydroxymethylaminomethanu
 - 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0

- deionizovanou vodou doplnit do 1000 ml
- TE pufr:
 - 1 ml Tris o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,0
 - 0,2 ml Na_2EDTA o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
 - doplnit do 100 ml deionizovanou vodou
- Vývojka:
 - 24 g uhličitanu sodného
 - 800 ml deionizované vody
 - uložit do chladničky
 - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.4 Seznam použitých laboratorních přístrojů

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Chlazená centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette - 0,5 až 10 μl (osmikanálová) a 0,3 μl až 1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μl až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Negatoskop NEGA 1 (Maneko)
- pH metr pH 210 (Hanna Instruments)
- Sekvenční elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- Ultracentrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Vodní lázeň SUB6 (Grant)

- Vortex mixer (Labnet International)
- Vyhřívaný blok (Labnet International)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

4.5 Izolace DNA

1. Navážít 500 mg listů rakytníku řešetlákového.
2. Do předchlazené (4 °C) porcelánové třecí misky vložit navážené listy.
3. Listy zalít tekutým dusíkem a rozdrtit tloučkem na jemný prášek.
4. Ke 2 ml CTAB pufru přidat 30 μ l β -merkaptoethanolu a tento roztok přidat k prášku a homogenizovat na jemnou kaši.
5. Homogenát přelít do 2ml mikrozkuřavky.
6. Mikrozkuřavku s homogenní směsí pečlivě zvortexovat a poté inkubovat hodinu a půl ve vodní lázni při 70 °C.
7. Co 10 minut mikrozkuřavku vytáhnout, zvortexovat a vrátit do vodní lázně.
8. Po inkubaci homogenát zcentrifugovat ve vychlazené centrifuze na 4 °C po dobu 10 minut při 15 000 g. Poté odpipetovat supernatant.
9. Do mikrozkuřavky přidat chloroform:IAA v poměru 24:1, zvortexovat a centrifugovat 5 minut při 13 000 g.
10. Vrchní vodnou fázi odpipetovat do nové mikrozkuřavky, do které opět přidat chloroform:IAA v poměru 24:1, zvortexovat a centrifugovat 5 minut při 13 000 g.
11. Do nové mikrozkuřavky přepipetovat supernatant, přidat 100 μ l roztoku octanu sodného a zbytek objemu mikrozkuřavky doplnit izopropylalkoholem. Převrácením promíchat. Dát do -20 °C na 30 minut.
12. Centrifugovat 20 minut při 15 000 g ve vychlazené centrifuze na 4 °C.
13. Supernatant odlít, mikrozkuřavku osušit o ubrousek.
14. Poté do mikrozkuřavky přidat 1 ml 70% ethanolu, převrácením promíchat.
15. Centrifugovat 10 minut při 15 000 g ve vychlazené centrifuze na 4 °C.
16. Slít supernatant, špičkou opatrně odsát zbytek roztoku kolem sedimentu.
17. Nechat volně vyschnout nebo vysušit v termobloku při 55 °C.
18. K peletu přidat TE pufr a změřit koncentraci vyizolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.

19. Podle naměřené koncentrace naředit vyzolovanou DNA v rozmezí 5–10 µg/ml a vzorky uchovat při –20 °C.

4.6 PCR amplifikace DNA rakytníku řešetlákového

PCR amplifikace byla provedena na genomické DNA 6 kultivarů rakytníku řešetlákového. PCR reakční směs byla připravena a do každého PCR mixu byl přidán jeden pár testovaných primerů.

1. Všechny složky PCR mixu rozmrazit, poté zvortexovat a krátce zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkušavek napipetovat složky PCR mixu podle Tabulky č. 3, dále PCR mix zvortexovat a krátce zcentrifugovat.

Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků (včetně počítaných ztrát při pipetování).

| Složky PCR mixu | Koncentrace | Objem [µl] |
|--------------------------|-------------------------|------------|
| Deionizovaná voda | - | 44,0 |
| Reaction Buffer | 10x | 6,7 |
| Roztok MgCl ₂ | 25 mmol·l ⁻¹ | 4,0 |
| Roztok dNTPs | 20 mmol·l ⁻¹ | 0,7 |
| Primer F | 10 µmol·l ⁻¹ | 3,3 |
| Primer R | 10 µmol·l ⁻¹ | 3,3 |
| aTaq DNA polymeráza | 5 U·µl ⁻¹ | 1,5 |

3. Do 6 PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml napipetovat 1 µl genomické DNA rakytníku řešetlákového a dále napipetovat 9 µl připraveného PCR mixu.
4. Mikrozkušavky vložit do přednastaveného termocykleru. Základní časový a teplotní profil PCR reakce je následující:
 - a. 94 °C: 5 min
 - b. 94 °C: 30 s
 - 50 °C: 30 s
 - 72 °C: 30 s
 - c. 72 °C: 7 min

} 35 cyklů

Podle tohoto schématu probíhala počáteční reakce s každým párem primerů. Při následujícím opakování byla teplota *annealingu* primerů upravena pro jednotlivé mikrosatelity (viz kapitola Výsledky).

4.7 Amplifikované mikrosatelitní lokusy na DNA rakytníku řešetlákového

Celkově bylo k PCR amplifikaci použito 48 párů primerů. Seznam použitých mikrosatelitů je uveden v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Mikrosatelity testované v rámci této bakalářské práce na 6 kultivarech rakytníku řešetlákového.

| Mikrosatelit | Literární zdroj |
|--|---------------------------|
| Hr01, Hr02, Hr03, Hr04, Hr05, Hr06, Hr07, Hr08, Hr09 | Wang <i>et al.</i> , 2008 |
| USSM 1, USSM 3, USSM 5, USSM 7, USSM 8, USSM 12, USSM 13, USSM 16, USSM 24, USSM 25, USSM 26 | Jain <i>et al.</i> , 2014 |
| USSM 30, USSM 31, USSM 34, USSM 50, USSM 66 | Jain, 2015 |
| SB 1, SB 2, SB 3, SB 4, SB 5, SB 6, SB 7, SB 8, SB 9, SB 10, SB 11, SB 12, SB 13, SB 14, SB 15, SB 16, SB 17, SB 18, SB 19, SB 20, SB 21, SB 22, SB 23 | Li <i>et al.</i> , 2020 |

4.8 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Tento postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 220 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

1. Plochu obou skel (velkého a malého), která se bude dotýkat gelu, důkladně dvakrát opláchnout deionizovanou vodou, osušit, dvakrát opláchnout 96% ethanolem a opět osušit papírovou utěrkou.
2. Větší sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, přípravkem pro odpuzování vody ze skel automobilů (Rain-off - tekuté stěrače, Sheron), ten rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, poté opláchnout dvakrát deionizovanou vodou a osušit papírovou utěrkou.

3. Menší sklo ošetřit v digestoři na ploše, která se bude dotýkat gelu, roztokem 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu. Ten rozetřít papírovým ubrouskem a nechat 5 minut zaschnout, poté čtyřikrát opláchnout 96% ethanolem a pokaždé osušit papírovým ručníkem.
4. Na rovnou podložku v digestoři (polystyrenová deska) umístit větší sklo ošetřenou plochou nahoru, na něj po jeho delších okrajích položit dva 0,4 mm silné spacers a na ně položit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Spacerů umístit až do kraje skel, gumu spaceru přiložit k menšímu sklu tak, aby se jej těsně dotýkala. Na jedné kratší straně jsou hrany skel přesně v zákrytu, na protilehlé kratší straně jsou konce skel vzájemně posunuty přibližně o 2,5 cm. V místě spacerů skla na každé straně sepnout dvěma klipsy.
5. Gel připravit v kádince smísením 60 ml 6% roztoku akrylamid:N,N'-methylenbisakrylamid 19:1, 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 40 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu. Roztok dobře promíchat a pomalu ho nalévat mezi skla a zároveň při tom na sklo druhou rukou poklepávat, aby se předešlo vzniku bublin v gelu.
6. Když je vyplněn celý prostor mezi skly gelem, vsunout mezi skla v místě, kde se plnil tento prostor gelem, hřebínek jeho rovnou stranou asi 0,7 až 1 cm hluboko. V místě hřebínku skla sepnout čtyřmi klipsy a gel nechat nejméně hodinu polymerizovat.
7. Po ztuhnutí gelu odstranit všechny klipsy a skla důkladně omýt vodou a pomocí kartáčku zbavit od všech zbytků polyakrylamidu, se zvláštním důrazem a opatrností v oblasti hřebínku. Menší sklo poté osušit a pevně upevnit pomocí šroubovacích úchyťů do elektroforetické komůrky hranou s hřebínkem nahoru a menším sklem k hliníkové desce elektroforetické komůrky. Uzavřít bočním ventilem vypouštěcí kanálek pro pufr.
8. Katodový i anodový prostor zalít 0,5x TBE puftrem, opatrně vytáhnout hřebínek a vzniklou mezeru mezi skly dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky. Katodový i anodový prostor uzavřít, nasadit elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Za těchto podmínek nechat gel předeřhřát 30 minut.
9. Mezitím si připravit vzorky, ke každému produktu PCR přidat 5 μ l nanášecího pufru. Pak vzorky vložit do termocykleru a nechat denaturovat po dobu 3 minut.

Po denuraci vzorky okamžitě umístit do ledové tříště, aby se zabránilo renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.

10. Během denaturace zatím vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit katodu, otevřít katodový prostor a znovu dobře vyčistit proudem pufru z injekční stříkačky mezeru pro hřebínek od zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do této mezery mezi skly vsunout hřebínek zoubky asi 1 mm hluboko do gelu tak, aby nedošlo k ulomení některého zoubku.
11. Nyní je možné nanést pomocí osmikanálové pipety po 2 μ l připravených vzorků do mezer mezi zoubky hřebínku. Na všechny vzorky použít tytéž špičky, které mezi nanášením rozdílných vzorků pročistit několikerým nasátím a vypuštěním pufru z katodového prostoru pipetou. Po napipetování všech vzorků katodový prostor uzavřít, nasadit elektrodu a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu jako limitní faktor nastavit hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA).
12. Čas separace vzorků závisí na relativních molekulových hmotnostech rozdělovaných PCR produktů. Orientačně je možné se řídit pomocí barviv v nanášecím pufru, jimiž jsou bromfenolová modř a xylenová modř, které ukazují průběh elektroforézy. Přičemž platí, že v 6% polyakrylamidovém gelu se bromfenolová modř pohybuje stejně rychle jako řetězce DNA dlouhé přibližně 60 párů bází a xylenová modř jako řetězce DNA dlouhé přibližně 220 párů bází. Obvyklá doba separace vzorků je 1 až 3 hodiny.
13. Během elektroforetického dělení vzorků připravit následující roztoky: 800 ml roztoku 10% kyseliny octové (fix/stop roztok), 800 ml roztoku 1% HNO_3 a 800 ml 3% roztoku Na_2CO_3 (vývojka). Vývojku jako jedinou umístit do chladničky, aby se vychladila na teplotu nižší než 10 °C.
14. Po uplynutí času elektroforetického dělení vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a kolečkem na pravé straně elektroforetické komůrky otevřít kanálek, kterým pufr z katodové části přeteče do sběrného prostoru, povolit šrouby úchytů skel a skla s gelem vyjmout a položit do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Z prostoru mezi skly opatrně vytáhnout oba spacery a hřebínek a skla od sebe odpáčit pomocí čepele nože.
15. Odchlípené menší sklo s přilepeným gelem otočit gelem nahoru a uložit do fotomisky (též gelem nahoru), umístit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku na gel je přibližně 20 minut a orientačně je možné

charakterizovat dostatečný čas působení vymytím modrého pruhu xylenové moře z gelu do roztoku.

16. Následně fix/stop roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem promýt 3x přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody. Pak následuje čtyř minutové promytí gelu na třepačce v 1% roztoku HNO₃, vylítí tohoto roztoku do odpadu a promytí gelu 4x přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody.
17. Do roztoku 0,1% AgNO₃ přidat 1,2 ml formaldehydu. Sklo s gelem přemístit do další fotomisky a umístit na třepačku. Zalít s připraveným roztokem 0,1% AgNO₃ a nechat působit po dobu 30 minut.
18. Na konci této doby připravit jednu fotomisku s 1–2 l deionizované vody a do 800 ml vychlazeného 3% roztoku Na₂CO₃ (vývojka) přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku Na₂S₂O₃.
19. Po uplynutí 30 minut fotomisku s gelem v roztoku AgNO₃ sejmut z třepačky a roztok slít zpět do zásobní láhve. Sklo s gelem vyjmout a na 5 vteřin ponořit do misky s deionizovanou vodou, nechat okapat a přemístit do fotomisky pro vývojku, umístit na třepačku a zalít gel vývojkou, kde se sleduje vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů.
20. Když jsou proužky již dostatečně zřetelné a ještě, než začne vystupovat tmavé pozadí, tak vyvíjení zbarvení zastavit přilítím fix/stop roztoku uchovaného z kroku 16. Roztok nechat působit na gel 2 minuty. Dobu působení je možné orientačně odhadnout podle toho, jestli z roztoku ještě masivně uniká v podobě bublinek vyloučený CO₂.
21. Sklo s gelem potom ponořit asi na 2 minuty do deionizované vody, a pak přenést na 30 minut do sušárny, kde se gel při 90 °C vysuší.
22. Usušený gel vyhodnotit na negatoskopu a poté naskenovat.
23. Sklo s již nepotřebným gelem ponořit na několik desítek minut až několik hodin do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l. Gel by se měl kompletně odlepit a pokud ne, tak jej ze skla strhnout pomocí škrabky. Sklo se umyje a je znovu k použití.

5 Výsledky

V experimentální části mé bakalářské práce jsem používala metodu PCR amplifikace a s její pomocí jsem se snažila najít vysoce polymorfní a dobře hodnotitelné mikrosatelity, které by v budoucnu bylo možné použít pro kultivarové odlišení odrůd rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*), které jsou komerčně dostupné. Testovala jsem 48 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů, které byly v předchozích pracích popsány jako polymorfní na asijských poddruzích rakytníku řešetlákového. Primery jsem testovala na 6 kultivarech rakytníku řešetlákového pěstovaných v České republice. Jednalo se o kultivary, které byly vyšlechtěny v geograficky různých oblastech anebo v různém časovém období.

Nejprve byly všechny páry primerů amplifikovány při teplotě *annealingu* 50 °C, kdy následně byly teploty upravovány podle výsledného produktu. Teplota *annealingu* byla snižována až na 44 °C, pokud nebyl žádný PCR produkt nebo byl velmi slabý. V případě, že byl PCR produkt velmi silný a špatně hodnotitelný, tak byla teplota *annealingu* postupně zvyšována až na 68 °C. Kromě teplot *annealingu* byl upravován i objem (respektive koncentrace) hořčnatých iontů v PCR mixu. Z původního objemu 4 µl byl objem snížen na 2 µl (poloviční snížení objemu, respektive poloviční snížení koncentrace z 25 mmol·l⁻¹ na 12,5 mmol·l⁻¹) nebo na 2,6 µl (dvoutřetinové snížení objemu, respektive dvoutřetinové snížení koncentrace z 25 mmol·l⁻¹ na 16,25 mmol·l⁻¹) a o tento objem (2 µl, respektive 2,6 µl) byl zvýšen celkový objem vody v PCR mixu tak, aby nedošlo ke změně celkového objemu PCR mixu. Tuto změnu jsem provedla v případě dvou mikrosatelitů, poloviční snížení jsem provedla u USSM 1 a dvoutřetinové snížení jsem provedla u Hr03. Také byl zvýšen objem (tedy koncentrace z 25 mmol·l⁻¹ na 37,5 mmol·l⁻¹) hořčnatých iontů, a to na 6 µl, kdy o stejný objem byl snížen celkový objem vody v PCR mixu. Tuto změnu jsem provedena u mikrosatelitu SB 21.

Celkově jsem otestovala 48 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů na 6 kultivarech rakytníku řešetlákového. Z těchto mikrosatelitů jsem vyřadila mikrosatelit Hr04, jelikož neposkytl žádný PCR produkt, přestože teplota *annealingu* byla snížena až na 44 °C. Dále jsem vyřadila 8 mikrosatelitů, které na mnou testovaných kultivarech amplifikovaly monomorfní lokus (konkrétně se jednalo o mikrosatelity Hr05, Hr06, Hr07, Hr08, Hr09, USSM 26, USSM 34 a SB 12). A také jsem vyřadila 3 polymorfní mikrosatelity (Hr01, Hr02 a Hr03), které sice vykazovaly polymorfismus,

ale nebylo možné je vyhodnotit. Tudíž z 48 testovaných párů primerů poskytlo hodnotitelný polymorfní PCR produkt 36 párů primerů (viz Tabulka č. 5).

Je zvykem u lokusů mikrosatelitů uvádět i kódy z databáze (například Acc. No. z databáze GenBank). Já v Tabulce č. 5 neuvádím kódy z databáze, jelikož samotní autoři ve svých pracích neuvádějí žádné kódy (Jain *et al.*, 2014; Jain, 2015; Li *et al.*, 2020).

Tabulka č. 5: Charakteristika 36 polymorfních a hodnotitelných lokusů, které byly testovány na 6 kultivarech rakytníku řešetlákového. V tabulce je uveden název lokusu, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel, doba trvání elektroforetické separace a teplota *annealingu* (T_a).

| Lokus | Sekvence primerů (5' → 3') | Jednotka repetice | Počet alel | Čas separace [min] | T_a [°C] |
|---------|---|-------------------|------------|--------------------|------------|
| USSM 1* | F: GGCGGAACTTGA CT TGT TGC R: ACCGATCAATACCGTTCTGC | TAC | 7 | 90 | 62 |
| USSM 3 | F: AAGGATGTGGTCGATCCAAG R: GTTTGCAGGCATTCTTTGT | TTC | 3 | 90 | 68 |
| USSM 5 | F: TTCGATCGGATAAGGTCATTG R: GCAGTCGAGGAGGTTTGAAG | AC/AT | 7 | 90 | 68 |
| USSM 7 | F: TCGCCGTCTGTTTCAGATAA R: GCTGATCCAACGGTCTCATT | AG | 7 | 90 | 60 |
| USSM 8 | F: GGTCGGAGATGATTCAAAGC R: TACGCTCTCAACGCTTGCTA | TCTTCA | 2 | 180 | 66 |
| USSM 12 | F: CGTCACCGTCAGTTCAGAGA R: AAGGAGACGCAGACGAAGAG | AAG | 2 | 180 | 66 |
| USSM 13 | F: GATATGCCGGCGGTAAACTA R: TGTACCACTTCTGCTGCTG | CAG/CAC | 3 | 90 | 51 |
| USSM 16 | F: CCAACCAACCTCATCGTTTC R: ATCGGAGGGATCGTTGAAAG | TC | 5 | 90 | 61 |
| USSM 24 | F: TAGCATTGCAGGCTCAGAGA R: ATCCGTGGTTAAGGTTGCAC | AG | 2 | 180 | 67 |
| USSM 25 | F: CGAGGTCCGAGTAGGAAGA R: CATTGGCCTTCAATCTCCTC | AAG | 3 | 90 | 63 |
| USSM 30 | F: GAAAGTCCTCGTCTTCTCT R: AGAGGAAGGGAGATAGATGG | TTCTC | 3 | 90 | 52 |
| USSM 31 | F: GTGCAGCAGCAGCTATTAAG R: GTGGATGCAGTGGAATAGAC | TTG | 3 | 90 | 63 |

Pozn.: * 2 μ l hořčičných iontů v PCR mixu (koncentrace 12,5 mmol·l⁻¹)

Tabulka č. 5: Pokračování 1.

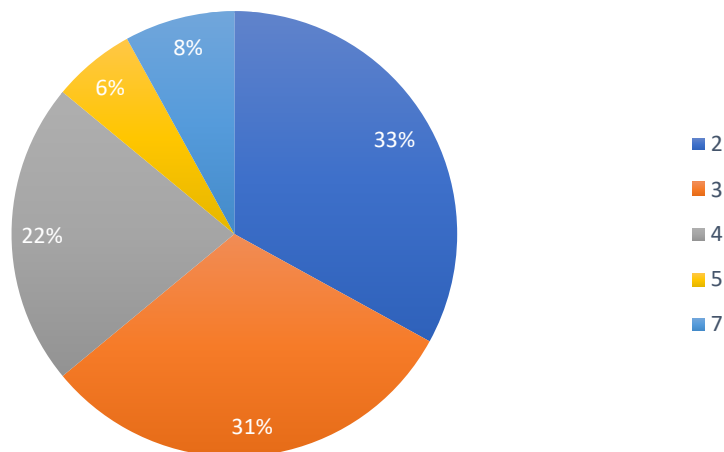
| Lokus | Sekvence primerů (5' → 3') | Jednotka repetice | Počet alel | Čas separace [min] | T _a [°C] |
|---------|--|-------------------|------------|--------------------|---------------------|
| USSM 50 | F: GGTCAGCCAAAGCAGTAAGT R: CGTGTTAGGCTAGCTTTAGG | CTCCTT | 4 | 90 | 54 |
| USSM 66 | F: TGACCTACATTGACCCTTGG R: GTAGGACTCACCACCCACAT | CTCCC | 2 | 90 | 60 |
| SB 1 | F: CATGTAGCCCAGCAGTATTGAA R: AGAGGGCAAGAAGGAGAAGAAG | neuveđeno | 2 | 90 | 65 |
| SB 2 | F: ATGTGGATTGGTTTAGCAACACT R: ACTCGACAAAATCCCCTAAAGG | neuveđeno | 3 | 90 | 63 |
| SB 3 | F: GTCACAAGGGCTAATGTTACTGC R: GCAATGGGTTTAAGGGTATGAGT | neuveđeno | 5 | 90 | 65 |
| SB 4 | F: ACCTCTAGGATTTCACTTTCTTGT R: GGTCGTATCCATATGACACTCGT | neuveđeno | 4 | 120 | 63 |
| SB 5 | F: AGTCTTCGGATAGGTCGTCATC R: CAAAGAACCTAACCCACTGCTAC | neuveđeno | 3 | 90 | 65 |
| SB 6 | F: GACAATTTTTCCCATGTTGTAGC R: GAAATTTAAAATCCCAGTTCATGG | neuveđeno | 2 | 120 | 64 |
| SB 7 | F: TGGAAATAGTAACAATGGGCAGT R: GTTCACGAATTTTCATCTGCTTCT | neuveđeno | 2 | 90 | 63 |
| SB 8 | F: AGAGATAGTGGAGTAAGTCCC GC R: CAAATCGAAGAAGTGATCAGGTTA | neuveđeno | 3 | 90 | 66 |
| SB 9 | F: CACCATCATAATACCCAAAATGG R: TTGTATTTGTCGCATTGTTTCCT | neuveđeno | 2 | 90 | 55 |
| SB 10 | F: ATAAACAAATGGGCAAATCAGTG R: TTCTTCTTCATCACCACAATCCT | neuveđeno | 4 | 90 | 60 |
| SB 11 | F: TGTATACTCCCCACCAACAACAT R: GTGATGACATCGTATCCAGATCA | neuveđeno | 3 | 90 | 54 |

Tabulka č. 5: Pokračování 2.

| Lokus | Sekvence primerů (5' → 3') | Jednotka repetice | Počet alel | Čas separace [min] | T _a [°C] |
|---------|---|-------------------|------------|--------------------|---------------------|
| SB 13 | F: AAGCTGGAGGAACTAGAGTAGCC R: TGATATTTTTGATTCAGGGATCG | neuveđeno | 3 | 90 | 57 |
| SB 14 | F: GATTTGCTTTTCCTTAAAGCTGG R: ATCAAAAGAAGGAAACCCAGAAG | neuveđeno | 4 | 120 | 63 |
| SB 15 | F: AGGTCTGATCATTGACATTTGCT R: ATCACGGGACCCTATATCATACC | neuveđeno | 2 | 90 | 60 |
| SB 16 | F: TTGTTCAATCTAGGAGGCAGAAG R: TGGTAGTGTTGGTTCAACAAGTG | neuveđeno | 2 | 90 | 62 |
| SB 17 | F: GTTTCGGATTCAAAGAACAAGAG R: GCATATGCAACCTATGAACCAAC | neuveđeno | 2 | 90 | 64 |
| SB 18 | F: GAGTTAATCGATGGATAATGATTG R: TTCCTTCATTTGAAACCTCATTC | neuveđeno | 4 | 90 | 60 |
| SB 19 | F: ATTATTTGCCCATGCTGACTAAC R: CAGCTTCTTCTACACCCAAGCTA | neuveđeno | 3 | 90 | 67 |
| SB 20 | F: TGTTCTGCTAAGAACTTCAACCA R: TTCAGAAATTACTGCAGACATGA | neuveđeno | 4 | 120 | 50 |
| SB 21** | F: CGGCTGAGATGTAGTAGAAGCTG R: TCATCATCGTCATCCTCACC | neuveđeno | 4 | 90 | 44 |
| SB 22 | F: TCAGTCATATTACAATTCACACGG R: TCACAACCTTAACATTTCAACCA | neuveđeno | 4 | 120 | 58 |
| SB 23 | F: TGAAGATCAACAACACTACCACC R: AAGAATCTGTGCCTTGAACCTGA | neuveđeno | 2 | 120 | 65 |

Pozn.: ** 6 μl hořečnatých iontů v PCR mixu (koncentrace 37,5 mmol·l⁻¹)

Z celkem 48 testovaných párů primerů poskytlo polymorfní a hodnotitelný PCR produkt 36, což znamená, že úspěšnost nalezení polymorfního a hodnotitelného mikrosatelitu je 75 %. U těchto polymorfních a hodnotitelných mikrosatelitů bylo detekováno 2–7 alel. U 12 polymorfních lokusů byly detekovány 2 alely, u 11 lokusů byly detekovány 3 alely, u 8 lokusů byly detekovány 4 alely, u 2 lokusů bylo detekováno 5 alel a u 3 lokusů bylo detekováno 7 alel. Procentuální zastoupení mikrosatelitů se 2 alelami je 33 %, mikrosatelitů se 3 alelami je 31 %, mikrosatelitů se 4 alelami je 22 %, mikrosatelitů s 5 alelami je 6 % a mikrosatelity se 7 alelami je 8 %. Na Obrázku 3 je znázorněno procentuální zastoupení mikrosatelitů s daným počtem alel.



Obrázek 3: Procentuální zastoupení počtu alel u mikrosatelitů. Legenda vpravo udává počet alel a čísla v grafu udávají procentuální zastoupení mikrosatelitů s daným počtem alel.

V Tabulce č. 6 jsou uvedeny genotypy všech 36 polymorfních mikrosatelitů u 6 kultivarů rakytníku řešetlákového.

Tabulka č. 6: Genotypy 36 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 kultivarů rakytníku řešetlákového. V tabulce je uveden název lokusu, počet alel, počet genotypů, heterozygotnost a genotypy.

| Mikrosatelit | Počet alel | Počet genotypů | Heterozygotnost | Genotypy u jedince | | | | | |
|--------------|------------|----------------|-----------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| USSM 1 | 7 | 5 | 1 | 4/7 | 1/7 | 3/7 | 2/6 | 5/6 | 2/6 |
| USSM 3 | 3 | 3 | 5/6 | 2/2 | 2/3 | 2/3 | 1/2 | 1/2 | 1/2 |
| USSM 5 | 7 | 6 | 1 | 3/7 | 2/7 | 4/6 | 1/6 | 3/5 | 5/6 |
| USSM 7 | 7 | 6 | 5/6 | 2/4 | 1/5 | 3/4 | 4/6 | 5/5 | 4/7 |
| USSM 8 | 2 | 2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
| USSM 12 | 2 | 3 | 1/2 | 1/1 | 2/2 | 1/2 | 1/2 | 2/2 | 1/2 |
| USSM 13 | 3 | 2 | 1 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 2/3 | 1/3 |
| USSM 16 | 5 | 6 | 2/3 | 1/2 | 2/5 | 2/2 | 3/5 | 3/4 | 4/4 |
| USSM 24 | 2 | 2 | 2/3 | 1/1 | 1/2 | 1/1 | 1/2 | 1/2 | 1/2 |
| USSM 25 | 3 | 4 | 1/2 | 3/3 | 1/2 | 3/3 | 1/3 | 2/2 | 1/3 |
| USSM 30 | 3 | 4 | 1/2 | 1/2 | 1/1 | 3/3 | 1/3 | 1/1 | 1/3 |
| USSM 31 | 3 | 3 | 0 | 2/2 | 3/3 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |
| USSM 50 | 4 | 4 | 1/3 | 3/3 | 4/4 | 3/3 | 1/2 | 1/1 | 1/2 |
| USSM 66 | 2 | 2 | 0 | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 1/1 |
| SB 1 | 2 | 2 | 5/6 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 2/2 | 1/2 |
| SB 2 | 3 | 3 | 1/3 | 2/2 | 1/2 | 2/2 | 2/3 | 2/2 | 2/2 |
| SB 3 | 5 | 5 | 1/2 | 3/3 | 2/5 | 3/4 | 1/1 | 1/3 | 1/1 |
| SB 4 | 4 | 5 | 1/2 | 2/3 | 3/3 | 1/4 | 2/2 | 1/3 | 2/2 |
| SB 5 | 3 | 3 | 1/2 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 1/2 | 2/3 |
| SB 6 | 2 | 2 | 1/6 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |
| SB 7 | 2 | 3 | 1/3 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 1/2 | 1/1 | 1/2 |
| SB 8 | 3 | 4 | 2/3 | 3/3 | 1/3 | 2/3 | 1/3 | 2/2 | 2/3 |
| SB 9 | 2 | 2 | 0 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |
| SB 10 | 4 | 4 | 1/3 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 2/4 | 2/3 |
| SB 11 | 3 | 3 | 2/3 | 2/3 | 2/3 | 2/2 | 2/2 | 1/2 | 2/3 |
| SB 13 | 3 | 3 | 1/2 | 3/3 | 1/3 | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 3/3 |
| SB 14 | 4 | 5 | 2/3 | 1/1 | 2/2 | 1/3 | 1/3 | 3/4 | 2/4 |
| SB 15 | 2 | 2 | 1/3 | 1/2 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |

Tabulka č. 6: Pokračování.

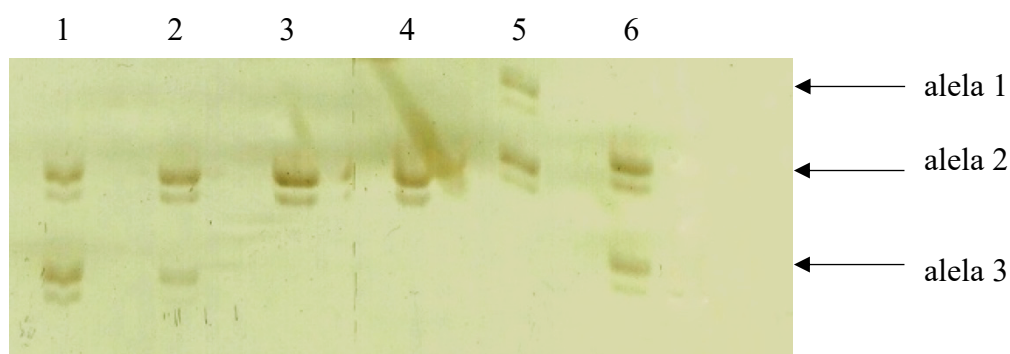
| Mikrosatelit | Počet alel | Počet genotypů | Heterozygotnost | Genotypy u jedince | | | | | |
|--------------|------------|----------------|-----------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| SB 16 | 2 | 2 | $1/2$ | $1/2$ | $2/2$ | $2/2$ | $1/2$ | $2/2$ | $1/2$ |
| SB 17 | 2 | 2 | $1/3$ | $1/2$ | $1/2$ | $2/2$ | $2/2$ | $2/2$ | $2/2$ |
| SB 18 | 4 | 5 | $1/2$ | $1/4$ | $1/2$ | $3/3$ | $3/3$ | $4/4$ | $3/4$ |
| SB 19 | 3 | 3 | $5/6$ | $2/2$ | $2/3$ | $2/3$ | $1/2$ | $1/2$ | $1/2$ |
| SB 20 | 4 | 5 | $1/6$ | $1/1$ | $2/2$ | $3/3$ | $3/3$ | $4/4$ | $3/4$ |
| SB 21 | 4 | 5 | $5/6$ | $2/4$ | $1/2$ | $1/4$ | $2/3$ | $2/2$ | $2/3$ |
| SB 22 | 4 | 5 | $2/3$ | $2/4$ | $1/2$ | $3/3$ | $3/4$ | $4/4$ | $3/4$ |
| SB 23 | 2 | 2 | $1/2$ | $2/2$ | $2/2$ | $2/2$ | $1/2$ | $1/2$ | $1/2$ |

Všechny mikrosatelity vykazovaly polymorfismus, ale je pravděpodobné, že pro další studium budou vhodnější ty mikrosatelity s vyšším počtem alel, jelikož nejspíše budou mít vyšší vypovídající hodnotu. Dvojice mikrosatelitů USSM 3 a SB 19 poskytly totožné genotypy, rovněž jako dvojice mikrosatelitů SB 15 a SB 17, bude tedy potřeba další studium na větším počtu odrůd, aby se zjistilo, zda se jedná o jeden lokus, vazbu nebo náhodu. Mikrosatelity USSM 31, USSM 66 a SB 9 měly pouze homozygotní konstituci.

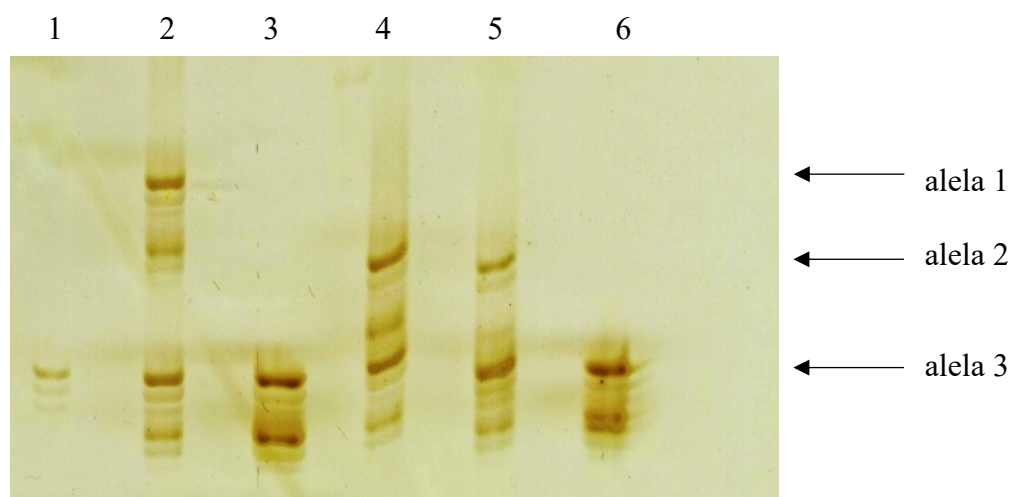
Jedenáct mikrosatelitů amplifikací na 6 kultivarech poskytlo 2 různé genotypy, devět mikrosatelitů poskytlo 3 různé genotypy, pět mikrosatelitů poskytlo 4 různé genotypy, osm mikrosatelitů poskytlo 5 různých genotypů a tři mikrosatelity poskytly 6 různých genotypů. Procentuální zastoupení mikrosatelitů s 2 různými genotypy je 31 %, mikrosatelitů se 3 různými genotypy je 25 %, mikrosatelitů se 4 různými genotypy je 14 %, mikrosatelitů s 5 různými genotypy je 22 % a mikrosatelitů s 6 různými genotypy je 8 %.

V populační genetice se často udává heterozygotnost neboli podíl heterozygotů v populaci. V rámci své bakalářské práce jsem vypočetla podíl heterozygotů u testovaných kultivarů. U 3 mikrosatelitů byla heterozygotnost 0, u 2 mikrosatelitů byla heterozygotnost $1/6$, u 6 mikrosatelitů byla heterozygotnost $1/3$, u 11 mikrosatelitů byla heterozygotnost $1/2$, u 6 mikrosatelitů byla heterozygotnost $2/3$, u 5 mikrosatelitů byla heterozygotnost $5/6$ a u 3 mikrosatelitů byla heterozygotnost 1.

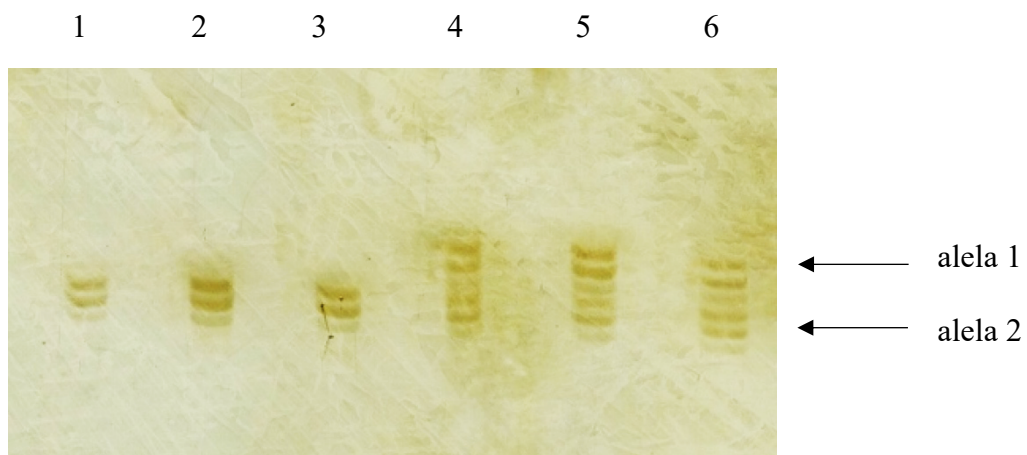
Pro hodnocení mikrosatelitů je důležité určení optimálních podmínek PCR amplifikace (např. vhodná teplota *annealingu*, správná koncentrace hořčičných iontů), doba elektroforetické separace a také výsledný obraz v gelu. Může se stát, že při elektroforetické separaci vzniknou další produkty, které způsobí problematické hodnocení mikrosatelitů, a proto mohou být výsledky polymorfismů a genotypů nespolehlivé. Příkladem nespolehlivých a špatně hodnotitelných mikrosatelitů mohou být mikrosatelity Hr01, Hr02 a Hr03, které jsem právě kvůli tomuto problému vyřadila. Avšak některé mikrosatelity byly velmi dobře hodnotitelné jako například SB 11 (viz Obrázek 4), SB 13 (viz Obrázek 5) a SB 23 (viz Obrázek 6).



Obrázek 4: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu SB 11 na šesti kultivarech rakytníku řešetlákového. Teplota *annealingu* byla při 54 °C a čas elektroforetické separace byl 90 minut. Čísla 1–6 jsou označení kultivarů, šípkami jsou vyznačené alely daného lokusu.



Obrázek 5: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu SB 13 na šesti kultivarech rakytníku řešetlákového. Teplota *annealingu* byla při 57 °C a čas elektroforetické separace byl 90 minut. Čísla 1–6 jsou označení kultivarů, šípkami jsou vyznačené alely daného lokusu.



Obrázek 6: Elektroforeticky separované produkty PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu SB 23 na šesti kultivarech rakytníku řešetlákového. Teplota *annealingu* byla při 65 °C a čas elektroforetické separace byl 120 minut. Čísla 1–6 jsou označení kultivarů, šipkami jsou vyznačené alely daného lokusu.

6 Diskuze

V této bakalářské práci jsem se věnovala hledání vysoce polymorfních a dobře hodnotitelných mikrosatelitů navržených pro rakytník řešetlákový pomocí PCR amplifikace na DNA 6 různých kultivarů rakytníku řešetlákového pěstovaných v České republice. Celkově jsem testovala 48 párů primerů navržených pro asijské poddruhy rakytníku řešetlákového, kdy 9 párů primerů navrhli Wang *et al.* (2008) pro *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*, 11 párů primerů pro *H. rhamnoides* navrhli a ve svých pracích publikovali Jain *et al.* (2014) a Jain (2015), dalších 5 párů primerů pro *H. rhamnoides* použitých v této bakalářské práci navrhl Jain (2015) a 23 párů primerů navrhli a testovali na *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* a *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* Li *et al.* (2020). V rámci experimentální části své bakalářské práce jsem našla 36 polymorfních a hodnotitelných mikrosatelitů.

Wang *et al.* (2008) navrhli 9 polymorfních mikrosatelitů pro *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*, a to Hr01–Hr09. Tyto mikrosatelity testovali na 12 jedincích *H. r.* ssp. *sinensis*. Mikrosatelity Hr01, Hr02 a Hr03 v mé experimentální práci poskytly polymorfní PCR produkt, ale bohužel nebyly dobře hodnotitelné. Wang *et al.* (2008) u mikrosatelitu Hr01 při teplotě *annealingu* 51 °C detekovali 12 alel, u mikrosatelitu Hr02 při teplotě *annealingu* 48 °C detekovali 6 alel a u mikrosatelit Hr03 při teplotě *annealingu* 50 °C detekovali 11 alel. Mikrosatelit Hr04 v mé práci neposkytl žádný produkt, a to ani v případě kdy byla teplota *annealingu* snížena až na 44 °C. Autoři ve své práci u mikrosatelitu Hr04 při teplotě *annealingu* 50 °C detekovali 4 alely. Mnou testované mikrosatelity Hr05–Hr09 poskytly monomorfní PCR produkt, ač Wang *et al.* (2008) uvádějí tyto mikrosatelity jako polymorfní. Všechny mikrosatelity publikované Wang *et al.* (2008) jsem vyřadila, i když podle autorů měly být polymorfní pro rakytník řešetlákový. V rámci mikrosatelitů z práce Wang *et al.* (2008) byla úspěšnost nalezení vysoce polymorfního a dobře hodnotitelného mikrosatelitu 0 %. Je tedy zvláštní, že autoři práce měli oproti mně tak vysokou úspěšnost (100 %) nalezení polymorfního a hodnotitelného mikrosatelitu v rámci stejného druhu rostliny.

Jain *et al.* (2014) navrhli 11 polymorfních mikrosatelitů pro rakytník řešetlákový, které testovali na 18 jedincích, zatímco já testovala pouze na 6 jedincích. U 4 mikrosatelitů jsem detekovala více alel, než detekovali Jain *et al.* (2014),

u 4 mikrosatelitů jsem našla menší počet alel, u 2 mikrosatelitů jsem našla stejný počet alel, ale při jiné teplotě *annealingu* a 1 mikrosatelit poskytl monomorfní PCR produkt (viz Tabulka č. 7). Z mikrosatelitů publikovaných Jain *et al.* (2014) jsem vyřadila pouze jeden, tudíž úspěšnost nalezení polymorfního a hodnotitelného mikrosatelitu je 91 %.

Tabulka č. 7: Srovnání mých výsledků testovaných na 6 jedincích s výsledky Jain *et al.* (2014). V tabulce jsou uvedeny názvy mikrosatelitů, mnou zjištěný počet alel a použitá teplota *annealingu* a počet alel a teplota *annealingu* v publikaci. M značí monomorfní lokus. Čísla v závorkách udávají počet testovaných jedinců.

| Mikrosatelit | Moje výsledky | | Jain <i>et al.</i> (2014) | |
|--------------|---------------------|------------|---------------------------|------------|
| | T _a [°C] | Počet alel | T _a [°C] | Počet alel |
| USSM 1 | 62 | 7 | 55 | 4 (18) |
| USSM 3 | 68 | 3 | 54 | 7 (18) |
| USSM 5 | 68 | 7 | 56 | 5 (18) |
| USSM 7 | 60 | 7 | 50 | 3 (18) |
| USSM 8 | 66 | 2 | 50 | 5 (18) |
| USSM 12 | 66 | 2 | 50 | 4 (18) |
| USSM 13 | 51 | 3 | 57 | 3 (18) |
| USSM 16 | 61 | 5 | 55 | 2 (18) |
| USSM 24 | 67 | 2 | 55 | 3 (18) |
| USSM 25 | 63 | 3 | 55 | 3 (18) |
| USSM 26 | 50 | M | 55 | 4 (18) |

Ve své práci Jain (2015) testoval 10 USSM mikrosatelitů z práce Jain *et al.* (2014) a 5 nově navržených USSM mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity testoval na 57 jedincích rakytníku řešetlákového rostoucích v Lehu (Indie) a na 41 jedincích rakytníku řešetlákového rostoucích v Lahaulu (Indie). U 4 mikrosatelitů jsem detekovala více alel, než detekovali Jain (2015), u 6 jsem našla méně alel, u 3 jsem našla stejný počet alel a 2 mikrosatelity poskytly monomorfní PCR produkt (viz Tabulka č. 8). Z USSM mikrosatelitů publikovaných Jain (2015) jsem vyřadila pouze dva, tudíž úspěšnost nalezení polymorfního a hodnotitelného mikrosatelitu je 87 %.

Tabulka č. 8: Srovnání mých výsledků testovaných na 6 jedincích s výsledky Jain (2015). V tabulce jsou uvedeny názvy mikrosatelitů, mnou zjištěný počet alel a použitá teplota *annealingu* a počet alel a teplota *annealingu* v publikaci. M značí monomorfní lokus. Čísla v závorkách udávají počet testovaných jedinců.

| Mikrosatelit | Moje výsledky | | Jain (2015) | |
|--------------|---------------------|------------|---------------------|----------------|
| | T _a [°C] | Počet alel | T _a [°C] | Počet alel |
| USSM 1 | 62 | 7 | 55 | 6 (57), 6 (41) |
| USSM 3 | 68 | 3 | 54 | 6 (57), 6 (41) |
| USSM 5 | 68 | 7 | 56 | 8 (57), 4 (41) |
| USSM 7 | 60 | 7 | 50 | 5 (57), 5 (41) |
| USSM 12 | 66 | 2 | 50 | 2 (57), 2 (41) |
| USSM 13 | 51 | 3 | 57 | 2 (57), 2 (41) |
| USSM 16 | 61 | 5 | 55 | 3 (57), 3 (41) |
| USSM 24 | 67 | 2 | 55 | 6 (57), 3 (41) |
| USSM 25 | 63 | 3 | 55 | 4 (57), 4 (41) |
| USSM 26 | 50 | M | 55 | 3 (57), 3 (41) |
| USSM 30 | 52 | 3 | 54 | 3 (57), 3 (41) |
| USSM 31 | 63 | 3 | 53 | 4 (57), 4 (41) |
| USSM 34 | 50 | M | 57 | 4 (57), 4 (41) |
| USSM 50 | 54 | 4 | 55 | 3 (57), 4 (41) |
| USSM 66 | 60 | 2 | 56 | 3 (57), 4 (41) |

Li *et al.* (2020) ve své práci navrhli a testovali 23 polymorfních mikrosatelitů na 52 jedincích *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*, 6 jedincích *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* a na 20 hybridech (*H. r.* ssp. *mongolica* x *H. r.* ssp. *sinensis*). U 9 mikrosatelitů jsem detekovala více alel, než detekovali Li *et al.* (2020), u 8 mikrosatelitů jsem našla méně alel, u 5 mikrosatelitů jsem našla stejný počet alel a 1 mikrosatelit poskytl monomorfní PCR produkt (viz Tabulka č. 9). Z mikrosatelitů publikovaných Li *et al.* (2020) jsem vyřadila pouze jeden, tudíž úspěšnost nalezení polymorfního a hodnotitelného mikrosatelitu je 96 %.

Tabulka č. 9: Srovnání mých výsledků testovaných na 6 jedincích s výsledky Li *et al.* (2020). V tabulce jsou uvedeny názvy mikrosatelitů, mnou zjištěný počet alel a použitá teplota *annealingu* a počet alel a teplota *annealingu* v publikaci. M značí monomorfní lokus. Čísla v závorkách udávají počet testovaných jedinců.

| Mikrosatelit | Moje výsledky | | Li <i>et al.</i> (2020) | |
|--------------|---------------------|------------|-------------------------|------------|
| | T _a [°C] | Počet alel | T _a [°C] | Počet alel |
| SB 1 | 65 | 2 | 58 | 3 (78) |
| SB 2 | 63 | 3 | 56 | 4 (78) |
| SB 3 | 65 | 5 | 60 | 4 (78) |
| SB 4 | 63 | 4 | 54 | 2 (78) |
| SB 5 | 65 | 3 | 60 | 4 (78) |
| SB 6 | 64 | 2 | 56 | 4 (78) |
| SB 7 | 63 | 2 | 56 | 2 (78) |
| SB 8 | 66 | 3 | 60 | 8 (78) |
| SB 9 | 55 | 2 | 54 | 2 (78) |
| SB 10 | 60 | 4 | 60 | 3 (78) |
| SB 11 | 54 | 3 | 58 | 2 (78) |
| SB 12 | 50 | M | 60 | 3 (78) |
| SB 13 | 57 | 3 | 60 | 4 (78) |
| SB 14 | 57 | 4 | 60 | 2 (78) |
| SB 15 | 60 | 2 | 60 | 2 (78) |
| SB 16 | 62 | 2 | 60 | 4 (78) |
| SB 17 | 64 | 2 | 56 | 2 (78) |
| SB 18 | 60 | 4 | 55 | 2 (78) |
| SB 19 | 67 | 3 | 60 | 3 (78) |
| SB 20 | 50 | 4 | 58 | 2 (78) |
| SB 21 | 44 | 4 | 59 | 3 (78) |
| SB 22 | 58 | 4 | 59 | 3 (78) |
| SB 23 | 65 | 2 | 60 | 4 (78) |

Celkem jsem otestovala 48 párů primerů, dále je pro rakytník řešetlákový publikováno dalších 33 mikrosatelitních markerů, které by určitě bylo dobré otestovat (Jain *et al.*, 2010; Srihari *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2015). Také je publikováno 8 mikrosatelitů pro rakytník tibetský (Qiong *et al.*, 2017). Kromě toho je 11 mikrosatelitů pro hlošinu úzkolistou (Gaskin *et al.*, 2013) a 20 mikrosatelitů pro *Elaeagnus mollis* (Ye *et al.*, 2016), které by mohly být použity ke *cross-species* amplifikaci, ale je pravděpodobné, že úspěšnost bude nižší, jelikož se jedná o sesterský rod. Tato bakalářská práce se zabývá předběžným hledáním polymorfních mikrosatelitů pro rakytník řešetlákový, ale ráda bych v pokračující diplomové práci tyto markery popsala na větším množství odrůd, které se pěstují v České republice, abych mohla stanovit jejich populačně genetické vlastnosti a potvrdit využití těchto mikrosatelitů pro odrůdovou determinaci.

7 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem pomocí PCR amplifikace otestovala 48 párů primerů na 6 různých kultivarech rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*). Mikrosatelity používané v této práci byly navrženy pro rakytník řešetlákový. Mým cílem bylo nalézt vysoce polymorfní a dobře hodnotitelné mikrosatelity, které by bylo možné při dalším studiu použít pro kultivarové odlišení komerčně dostupných odrůd rakytníku řešetlákového.

Všechny páry primerů jsem nejprve otestovala při teplotě *annealingu* 50 °C a následně jsem teploty upravovala podle výsledného produktu. Pokud nebyl žádný produkt nebo byl velmi slabý, teplota byla snížena až na 44 °C. Naopak pokud byl produkt velmi silný a špatně hodnotitelný, byla teplota postupně zvyšována až na 68 °C. Z celkově testovaných 48 párů primerů jich 8 poskytlo monomorfní PCR produkt (jednalo se o mikrosatelity Hr05, Hr06, Hr07, Hr08, Hr09, USSM 26, USSM 34 a SB 12), mikrosatelit Hr04 neposkytl žádný PCR produkt a 3 poskytly polymorfní ale nehodnotitelný PCR produkt (konkrétně Hr01, Hr02 a Hr03). 36 z 48 testovaných mikrosatelitů poskytlo polymorfní a hodnotitelný PCR produkt. U všech polymorfních a hodnotitelných mikrosatelitů jsem určila počet alel, počet genotypů, heterozygotnost, genotyp, teplotu *annealingu* a délku elektroforetické separace. Počet alel se pohyboval od dvou do sedmi. Nejvyšší počet alel (7) jsem zaznamenala u lokusů USSM 1, USSM 5 a USSM 7. Počet genotypů se pohyboval od dvou do šesti. Nejvyšší počet genotypů (6) jsem zaznamenala u lokusů USSM 5, USSM 7 a USSM 16. Heterozygotnost byla od 0 do 1. Nejvyšší heterozygotnost (1) jsem zaznamenala u lokusů USSM 1, USSM 5 a USSM 13. Průměrná heterozygotnost byla 0,53.

8 Použitá literatura

- Abartene, D.Y., Malakhovskis, A.I. (1975): Combined action of a cytostatic preparation and sea buckthorn oil on bio-chemical indices. Lietuvos TSR Mokslu Akademijos Darbai Serija C Biologijos Mokslai, 1: 167–171.
- Andersson, S.C., Olsson, M.E., Johansson, E., Rumpunen, K. (2009): Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin A, as a Maturity Marker. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 250–258.
- Arimboor, R., Venugopalan, V., Sarinkumar, K., Arumughan, C., Sawhney, R.C. (2006): Integrated Processing of Fresh Indian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Berries and Chemical Evaluation of Products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 2345–2533.
- Bailey, L.H., Bailey, E.Z. (1978): Hortus Third: A concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. Macmillan Publishers.
- Baker, D. (1992): *Elaeagnus*: A Widely Distributed Temperate Nitrogen Fixer. dostupné online na: <https://web.archive.org/web/20090518173805/http://www.winrock.org/fnrm/factnet/factpub/FFACTS/Elaeagnus.html>, navštíveno dne 12. 3. 2022.
- Barl, B., Akhov, L., Dunlop, D., Jana, S., Schroeder, W.R. (2003): Flavonoid Content and Composition in Leaves and Berries of Sea Buckthorn (*Hippophae* spp.) Of Different Origin. Acta Horti, 626: 397–405.
- Bawa, A.S., Khanum, F., Singh, B. (2002): Seabuckthorn a wonder plant. Natural Product Radiance, 1: 8-15.
- Bekker, N.P., Glushenkova, A.I. (2001): Components of Certain Species of the Elaeagnaceae Family. Chemistry of Natural Compounds, 37: 97–116.
- Bernath, J., Foldesi D. (1992): Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A promising new medicinal and food crop. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 1: 27–35.
- Beveridge, T., Li, T.S., Oomah, B.D., Smith, A. (1999): Sea buckthorn products: manufacture and composition. Journal of Agricultural Food Chemistry, 47: 3480–3488.
- Bond, G. (1983): Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems, In: Gordon, J.C., Wheeler, C.T. (eds.). Biological nitrogen fixation in forest

- ecosystems: Foundations and applications, pp. 55–87, Forestry Sciences, Springer, Dordrecht.
- Bounous, G., Zanini E. (1988): The variability of some components and biometric characteristics of the fruits of six tree and shrub species. In: Lampone, mirtillo ed altri piccoli frutti, pp. 189–197, Atti convegno Trento, Rome, Ministero agricoltura e foreste.
- Buhatel, T., Vesa, S., Morar, R. (1991): Data on the action of sea buckthorn oil extract in the cicatrization of wounds in animals. Buletinul Institutului Agronomic Cluj-Napoca Seria Zootehnie si Medicina Veterinara, 45: 129–133.
- Cenkowski, S., Yakimishen, R., Przybylski, R., Muir, W.E. (2006): Quality of Extracted Sea Buckthorn Seed and Pulp Oil. Canadian Biosystems Engineering, 48: 3.9–3.16.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica, 142: 169–196.
- Dai, Y.R., Gao, C.M., Tian, Q.L., Yin, Y. (1987): Effect of extracts of some medicinal plants on superoxide dismutase activity in mice. Planta Medica, 53: 309–310.
- Eliseev, I.P. (1976): Biologically active substances in the fruits of *Hippophae rhamnoides* in Central Asia and the Caucasus. Biologicheski aktivnyye veshchestva plodov i yagod, 161–163.
- Ellegren, H. (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5: 435–445.
- Erkkola, R., Yang, B. (2003): Sea Buckthorn Oils: Towards Healthy Mucous Membranes. Women Health, 53: 53–57.
- Gaskin, J.F., Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M. (2013): Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*; Elaeagnaceae). Applications in Plant Sciences, 1: 1300013.
- Gatner, E.M.S, Gardner I.C. (1970): Observations on the fine structures of the root nodule endophyte of *Hippophae rhamnoides* L. Archives of Mikrobiology, 70: 183-196.
- Glazunova, E.M., Gachechiladze N.D., Bondar V.V., Korzinnikov Y.S., Potapova I.M., Gur'yanov A.F. (1984): Biochemical fruit characteisitics of *Hippophae rhamnoides* L. growing in the Western Pamirs. Rastitel'nye Resursy 20: 232–235.

- Glazunova, E.M., Gachechiladze, N.D., Litvinenko, V.I., Popova, T.P. (1985): Flavonoids in leaves of sea buckthorn growing in the Western Pamir mountains. *Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii*: 107–109.
- Godwin, I.D., Aitken, E.A.B., Smith, L.W. (1997): Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18: 1524–1528.
- Goel, H.C., Kumar, I.P., Samanta, N., Rana, S.V.S. (2003): Induction of DNA-protein cross-links by *Hippophae rhamnoides*: implications in radioprotections and cytotoxicity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 245: 57–67.
- Goel, H.C., Prasad, J., Singh, S., Sagar, R.K., Kumar, I.P., Sinha, A.K. (2002): Radioprotection by a herbal preparation of *Hippophae rhamnoides*, RH-3, against whole body lethal irradiation in mice. *Phytomedicine*, 9: 15–25.
- Gupta, P.K., Roy, J.K., Prasad, M. (2001): Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, 80: 524–535.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed*, 118: 369–390.
- Gurevich, S.K. (1956): The application of seabuckthorn oil on ophthalmology. *Vesttn Oftalmologii*, 2: 30–33.
- Gutiérrez, L., Ratti, C., Belkacemi, K. (2008): Effects of Drying Method on the Extraction Yields and Quality of Oils from Quebec Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Seeds and Pulp. *Food Chemistry*, 106: 896–904.
- Gutzeit, D., Baleanu, G., Winterhalter, P., Jerz, G. (2008): Vitamin C Content in Sea Buckthorn Berries (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) and Related Products A Kinetic Study on Storage Stability and the Determination of Processing Effects. *Journal of Food Science*, 2008: 9.
- Chen, C., Liu, B., Yu, Y. (1995): Studies on pigments of Seabuckthorn, *Hippophae*, 7: 34–40.
- Chen, J.H. (1991): Effect of the immunomodulating agents (BCG) and the juice of HRL on the activity of splenic NK cells and LAK cells from tumour bearing mice. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 11: 105–108.
- Chen, T.G., Ni, M.K., Li, R., Ji, F. (1991): Investigation of the biological properties of Central Asian Sea Buckthorn growing in the province of Kansu, China. *Chemistry of Natural Compounds*, 27: 119–121.

- Cheng, T., Li, T., Duan, Z., Cao, Z., Ma, Z., Zhang, P. (1990): Acute toxicity of flesh oil of *Hippophae rhamnoides* L. and its protection against experimental hepatic injury. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 15: 45–47.
- Christenhusz, M.J.M., Byng, J.W. (2016): The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261: 201–217.
- Chu, Q.C., Qu, W.Q., Peng, Y.Y., Cao, Q.H., Ye, J.N. (2003): Determination of Flavonoids in *Hippophae rhamnoides* L. And Its Phytopharmaceuticals by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Chromatographia*, 67–71.
- Islam, A., Sinha, P., Sharma, S.S., Negi, M.S., Tripathi, S.B. (2015): Isolation and Characterization of Novel Polymorphic Microsatellite Loci in *Hippophae rhamnoides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*.
- Jain, A. (2015): Analysis of microsatellite polymorphism in relation to geographical distribution and adaption of seabuckthorn in India. *Disertační práce*. University school of biotechnology, Guru Gobind Singh Indraprastha University, Sector-16C, Dwarka, New Delhi-110078.
- Jain, A., Ghangal, R., Grover, A., Raghuvanshi, S., Sharma, P.C. (2010): Development of EST-based new SSR markers in seabuckthorn. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16: 375–378.
- Jain, A., Chaudhary, S., Sharma, P.C. (2014): Mining of microsatellites using next generation sequencing of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) transcriptome. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 115–123.
- Jasra, A.W. (1998): Seabuckthorn: A Medicinal Plant for High Arid-Regions. *Asia Pacific Mountain Network*. National Aridland Development and Research Institute (NADRI), Pakistan, 3.
- Jiang, G. (2013): Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. In: Andersen, S.B. (ed.), *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, IntechOpen, London.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. (1997): Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytologist*, 137: 165–177.
- Joshi, S., Ranjekar, P., Gupta, V. (1999): Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, 77: 230–240.

- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309–334.
- Kallio, H., Yang, B.R., Tahvonen, R., Hakala, M. (1999): Composition of Sea Buckthorn Berries of Various Origins. Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.), Beijing.
- Krejcarová, J., Straková, E., Suchý, P., Herzig, I., Karásková, K. (2015): Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) As a Potential Source of Nutraceuticals and Its Therapeutic Possibilities. *Acta Veterinaria Brno*, 84: 257–268.
- Kukenov, M.K., Dzhumagalieva, F.D., Tatimova, N.G., Bespaev, S.B. (1982): Study of medicinal plant reserves and distribution atlas compilation in the Kazakh-SSR USSR and prospects of their use in public health service. *Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi Ser Seriya Biologicheskaya*, 1: 3–6.
- Lācis, G., Kota-Dombrovska, I. (2014): Assessment of genetic diversity of Latvian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) germplasm using molecular markers. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101: 333–340.
- Li, H., Ruan, C., Ding, J., Li, J., Wang, L., Tian, X. (2020): Diversity in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) accessions with different origins based on morphological characteristics, oil traits, and microsatellite markers. *PLoS ONE*, 15: e0230356.
- Li, T.S.C. (2003): Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): Production and Utilization. NRC Research Press, Ottawa, ISBN 0-660-19007-9.
- Li, T.S.C., Schroeder, W.R. (1996): Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*): A Multipurpose Plant, *Horticultural Technology*. 6: 370–378.
- Lian, Y. (1988): New discoveries of the genus *Hippophae* L. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 26: 235–237.
- Liu, J., Liu, Z. (1989): Research of Processing Technology for Seabuckthorn Concentrated Juice. Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.), Xian, China: 314-317.
- Lu, R. (1990): Seabuckthorn Resources and its Unexploited Potential in the Himalayan Region. International Center for Integrated Mountain Development (ICIMOD). MFS Series No. 12, Kathmandu, Nepal.
- Lu, R. (1992): Sea buckthorn: A multipurpose plant species for fragile mountains. International Center for Integrated Mountain Development (ICIMOD). Occasional Paper No. 20. Katmandu, Nepal.

- Ma, Z., Cui, Y., Feng, G. (1989): Studies on the Fruit Character and Biochemical Compositions of Some Forms within Chinese Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* Subsp. *sinensis*) in Shanxi, China. Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.), Xian.
- Mendelová, A., Mendel, L., Czako, P., Mareček, J. (2016): Evaluation of Carotenoids, Polyphenols Content and Antioxidant Activity in the Sea Buckthorn Fruit. *Potravinárstvo*, 10: 59–64.
- Morar, R., Cimpeanu, S., Morar, E., Marghitas, L., Rozalia, Z. (1990): Results of the use of certain phytotherapeutic preparations in the feeding of weaned piglets. *Buletinul Institutului Agronomic Cluj-Napoca. Seria Zootehnie si Medicina Veterinara*, 44: 101–108.
- Nikolić, T., Topić J. (2005): 13. Regionalno izumrle svojte. In: Nikolić, T., Topić, J. (eds.): *Crvena knjiga vaskulame flore Hrvatske*, pp. 80–101, Državni zavod za zaštitu prirode Republike Hrvatske.
- Pan, R., Zhang, Z., Ma, Y., Sun, Z., Deng, B. (1989): The Distribution Characters of Seabuckthorn (*H. rhamnoides* L.) and its Research Progress in China. Proceeding of International Symposium of Seabuckthorn (*H. rhamnoides* L.) Xian, China. The secretariat of International Symposium of Sea Buckthorn: 1–16.
- Paterson, A.H. (1996): Making genetic maps. In: Paterson, A.H. (ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 23–39, RG Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.
- Qiong, L., Zhang, W., Wang, H., Zeng, L., Birks, H.J.B., Zhong, Y. (2017): Testing the effect of the Himalayan mountains as a physical barrier to gene flow in *Hippophae tibetana* Schlect. (Elaeagnaceae). *PLoS ONE* 12: e0172948.
- Raffo, S., Paoletti, F., Antonelli, M. (2004): Changes in Sugar, Organic Acid, Flavonol and Carotenoid Composition during Ripening of Berries of Three Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Cultivars. *European Food Research and Technology*, 219: 360–368.
- Rajchal, R. (2009): *Sea buckthorn Management Guide*. Rufford Maurice Laing Foundation, UK and ComForM (Community Based Natural Forest and Tree Manag. in the Himalaya), Institute of Forestry, Pokhara, Nepal.
- Ranjith, A., Kumar, K., Venugopalan, V., Arumughan, C., Sawhney, R., Singh, V. (2006): Fatty Acids, Tocols, and Carotenoids in Pulp Oil of Three Sea Buckthorn

- Species (*Hippophae rhamnoides*, *H. Salicifolia*, and *H. Tibetana*) Grown in the Indian Himalayas. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83: 359–364.
- Rosch, D. (2004): Structure-Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Seabuckthorn Juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51: 4233–4239.
- Rousi, A. (1965): Observations on the cytology and variation of European and Asiatic populations of *Hippophae rhamnoides*. *Annales Botanici Fennici*, 2: 1–18.
- Rousi, A. (1971): The genus *Hippophae* L. A taxonomic study. *Annales Botanici Fennici*, 8: 177–227.
- Ruan, C.J., Li, D. (2005): AFLP fingerprinting analysis of some cultivated varieties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *Journal of Genetics*, 84: 311–326.
- Singh, V., Moersel, T. (2005): Development and commercialization of seabuckthorn: a German experience. In: Singh, V. (ed.), *Seabuckthorn (Hippophae L.): A multipurpose wonder plant*, vol. 2. Daya Publishing House, New Delhi, India, 576–584.
- Slavík, Bohumil (ed.): *Květena České republiky 5*. Praha: Academia, pp. 473–474. ISBN 80-200-590-0
- Small, E., Catling, P.M., Li, T.S.C. (2000): *Blossoming Treasures of Biodiversity: Seabuckthorn – An Ancient Crop with Modern Virtues*. Eastern Cereal and Oilseed Research Centre. Agriculture and Agri-Foods, Ottawa, Canada.
- Srihari, J.V., Bhawna, V., Kumar, N., Chahota, R.K., Singh, V., Rathour, R., Singh, S.K., Sharma, S.K., Sharma, T.R. (2013): Analysis of molecular genetic diversity and population structure in sea buckthorn (*Hippophae* spp. L.) from north-western Himalayan region of India. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 3183–3196.
- Swenson, U., Bartish, I.V. (2002): Taxonomic synopsis of *Hippophae* (Elaeagnaceae). *Nordic Journal of Botany*, 22: 369–374.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463–6471.
- Teleszko, M., Wojdylo, A., Rudziński, M., Oszmiański, J., Golis, T. (2015): Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63: 4120–4129.

- Tian, C., Lei, Y., Shi, S., Nan, P., Chen, J., Zhong, Y. (2004): Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers. *New Forests*, 27 :229–237.
- Tiitinen, K.M., Hakala, M.A., Kallio H.P. (2005): Quality components of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) varieties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 1692–1699.
- Valíček, P., Havelka E.V. (2008): *Rakytník řešetlákový: rostlina budoucnosti*. Benešov: Start, ISBN 978-80-86231-44-0.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.
- Wang, A., Zhang, Q., Wan, D., Yang, Y., Liu, J. (2008): Nine microsatellite DNA primers for *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* (Elaeagnaceae). *Conservation Genetics*, 9: 969–971.
- Wang, S. (1990): Studies on the chemical components in fruits of *Hippophae rhamnoides*. *Forest Research*. 3: 98–102.
- Watson, L., Dallwitz, M.J. (2015): *The Families of Flowering Plants: Elaeagnaceae*, dostupné online na: <https://web.archive.org/web/20150402004126/http://delta-intkey.com/angio/www/elaegna.htm>, navštíveno dne 12. 3. 2022.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
- Winter, P., Kahl, G. (1995): Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 438–448.
- Xu, M. (1994): The medical research and exploitation of sea buckthorn. *Hippophae*, 7: 32–84.
- Xu, Y. (2010): *Molecular plant breeding*. CAB International.
- Yang, B., Kallio, H. (2002): Composition and Physiological Effects of Sea Buckthorn (*Hippophae*) Lipids. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 160–167.
- Ye, Z., Wang, Z., Li, Y., Rao, G., Zhang, J. (2016): Development and Characterization of Microsatellite Markers in the *Elaeagnus mollis* Diels. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 36: 274–279.
- Yu, Z., Ao, F., Lian, Y. (1989): Discussion on the Problems of Origin, Classification, Community and Resource of Seabuckthorn in China. *Proceeding of International*

- Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.), Xian, China. The secretariat of International Symposium on Sea Buckthorn, 21–30.
- Yushipitsina, G.G., Chuprova, N.A., Repyakh, S.M. (1988): Fractionation and Amino Acid Compositon of Proteins of the Woody Verdure of Sea Buckthorn. *Chemistry of Natural Compounds*, 24: 348–350.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1–16.
- Zeb, A. (2004): Chemical and Nutritional Constituents of Sea Buckthorn Juice. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3: 99–106.
- Zhang, W., Yan, J., Duo, J., Ren, B., Guo, J. (1989): Preliminary Study of Biochemical Constitutes of Berry of Sea Buckthorn Growing in Shanxi Province and Their Changing Trend. *Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.)*, Xian.
- Zheng, J., Yang, B., Trépanier, M., Kallio, H. (2012): Effects of Genotype, Latitude, and Weather Conditions on the Composition of Sugars, Sugar Alcohols, Fruit Acids, and Ascorbic Acid in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *mongolica*) Berry Juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60: 3180–3189.