

**UNIVERSITY OF SOUTH BOHEMIA IN ČESKÉ BUDĚJOVICE**  
**FACULTY OF AGRICULTURE**

---

**UTILIZATION OF MOLECULAR MARKERS IN POTATO  
FOR VARIETY IDENTIFICATION AND GMO DETECTION  
AND QUANTIFICATION**

PhD Thesis

**Alena Nováková**

---

**2009**

**Supervisor:** Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of agriculture, Biotechnological Centre, the Czech Republic

**Supervisor specialist:** Ing. Jan Bárta, Ph.D. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of agriculture, the Czech Republic

**Annotation:** This study is focused on the possibility of molecular markers usage in potato characterisation. Several molecular markers techniques based on PCR were used for solution of following tasks: potato variety identification and GMO detection and quantification. I find the chosen molecular markers and techniques as powerful tools for both these task with respect to the required aims.

**Grant support:** This study was supported by NAZV 1B44011, GACR 31-H160, GACR 521/08/H042 and IG grants 2006-2008.

I affirm that I elaborated this PhD thesis alone using only the literature cited.

České budějovice, April 30, 2009

.....

ACKNOWLEDGEMENT:

My thanks go to the team of the Biotechnological Centre of Agriculture Faculty, University of South Bohemia in České Budějovice, and especially to supervisor Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D. and supervisor specialist Ing. Jan Bárta, Ph.D. for the scientific lead and material support. I thank to the scientific institutions which enable me passed out my fellowships and helped to the spread of my knowledge, interests and above all experience.

## TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION .....	1
2. AIMS OF THE THESIS .....	4
3. LITERATURE REVIEW .....	5
3.1. General Background .....	5
3.2. Molecular Markers Techniques .....	9
3.2.1. RFLP .....	10
3.2.2. PCR and PCR Based Techniques .....	11
3.2.2.1. RAPD .....	11
3.2.2.2. AFLP .....	12
3.2.2.3. SSR .....	13
3.2.2.4. Transposones and Retrotransposones .....	16
3.3. Molecular Marker Assisted Selection .....	18
3.4. GMO Detection and Quantification .....	20
4. REFERENCES .....	24
5. CONCLUSION .....	39
6. OVERVIEW OF THE OBTAINED RESULTS .....	41
7. PAPERS .....	43
7.1. Molecular markers in potato breeding and variety identification .....	44
7.2. Utilization of molecular markers based on microsatellites Polymorphism for potato variety identification cultivated in CR .....	66
7.3. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses .....	78
7.4. Methodology of DNA isolation and molecular markers analysis for description of genetic resources and identification of potato varieties ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) .....	89
7.5. Methodology of DNA isolation and GMOs detection in potato ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) .....	147
8. THE LIST OF AUTHOR THESIS PUBLICATIONS .....	175
9. SUMMARY IN CZECH .....	176

## ABBREVIATIONS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed – PCR
CBP	Cartagen Protocol about the Biological safety
DUS	Distinctness, Uniformity and Stability
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ENGL	European Network of GMO Laboratories
GM	Genetically modified
GMO	Genetically modified organism
GMPs	genetically modified plants
IRAP	Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
ISSR	Inter Single Sequence Repeat
LTR	Long-Terminal Repeat
MMAS	Molecular Marker Assisted Selection
ORFs	Open Reading Frames
PBR	Plant Breeders Rights
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGI	Potato Genetic Identification
PLRV	Potato Leaf Roll Virus
PVS	Potato Virus S
QTLs	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RBIP	Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism
REMAP	Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RL	Reference Laboratory
SSAP	Sequence-Specific Amplified Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STSM	Sequence-Tagged Site Microsatellites

## 1. INTRODUCTION

Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is, along with wheat, rice and maize, one of the four most valuable crops worldwide. Potato is an important food crop, as well as being widely used for livestock feeding and industrial processing as feedstock for many industrial and food applications. Currently, there are more than 4,000 different potato varieties that are cultivated in over 100 countries worldwide (PIETERSE & HILS 2007). The improvement and creation of new varieties with new combinations of current characteristics or essentially new traits, such as GM potato (Genetically Modified) potatoes or conventional varieties with better parameters of quality or resistance to biotic and abiotic factors, is one of the main goals of plant breeding. In many cases, wild allied species or “old primitive” varieties are used as donors of these traits. New breeding approaches based on molecular markers allows a more efficient utilization of these donors (CALLOW *et al.* 1997).

Potato breeders worldwide know that for variety improvement and the acquisition of new, more productive traits resulting in higher yield, it is necessary to extend the gene pool of the valuable traits donors. The success of a breeding program is dependent on new knowledge and study of the genetic diversity of germplasm, because part of this material frequently presents the interesting genotypes. These genotypes are at once donors of new or improving characters. The breeder’s advantage is the ability to detect requested characters already in the early stages of the plant development and in the early generation of the breeding process. Our ability to identify and varieties distinguish of agricultural and horticultural crops are thus fundamental for the process of the modern breeding and seed trade. All sectors of the industry, from breeders through the registration authorities, seed producers, seed certification and testing agencies, farmers, growers, processing industry and other end users, benefit from variety verification at any stage of their activities (GÖRG *et al.* 1992). The traditional approach to variety identification is composed of the morphological characters or descriptors observation and recording. While in practice this is largely successful and forms the basis, for instance the most current testing procedures for Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) and the granting of Plant Breeders Rights (PBR), on the other hand it can be an expensive and time-consuming process. The number of useful descriptors is limited in some species. For example, the guideline for potatoes consists of 50 characters, 12 thereof are concerned with sprouting, along with a series of characters such as plant height, leaf size and various features

of the flowers and tubers. Such an approach is undoubtedly successful for DUS testing (COOKE 1999). However, it is less suitable when results are required rapidly, as well as for the confirmation of tuber material identification. Furthermore, morphological characters are often multigenic, continuously expressed and influenced by environmental interactions, which make them difficult to assess quickly and objectively (KIM *et al.* 1997). Together with advances in molecular biology, several new molecular and biochemical marker techniques are already adopted. These techniques are powerful tool for determining genetic distinctness and enable characterization of particular genotypes (COOKE 1999). The first group of these approaches is techniques based on the protein polymorphism. These techniques have several disadvantages, the basic storage protein and isozyme analyses drawback is the availability of markers for only a limited number of genes and potential traits, coverage of the genome is low, and are strongly influenced by plant ontogenetic stage and environmental conditions (DESBOROUGH & PELOQUIN 1968). The second group consists of molecular markers techniques based on DNA (Deoxyribonucleotide Acid) analysis. This is an important development because detection of requested traits is not influenced by environmental factors. The molecular markers have been widely applied for exact determination of genetic variability of varieties based on DNA analysis to further improvement of agricultural crops (STAUB *et al.* 1996). Molecular markers also allow genotypic selection instead of traditional phenotypic selection. This approach is mostly used in the newly developed breeding system called Molecular Marker Assisted Selection (MMAS) (PATERSON *et al.* 1991). MMAS is the example of the highly effective utilization of plant biotechnology in crop breeding. One of the first and very important applications of MMAS described by TANKSLEY *et al.* (1989) was the use this system to monitor the gene introgression from a donor genotype to a recurrent one through a backcross breeding scheme. Plant and potato breeders, as well as state control and inspection authorities, need reliable tools for variety identification. Further demands are their routine application to large number of analyzed samples. All of these requirements are complicated enough for the enormous number of registered potato varieties; there are listed more than 1216 varieties in the EU (European Union) catalogue of registered varieties (Common catalogue of varieties of agricultural plant species 2008) and this number is continually increasing with new varieties being registered.

During the seventies and the eighties of twentieth century there were developed technologies that allow preparing the recombinant DNA, the molecule whose particular parts come from different organisms and the acquired organisms are called genetically modified

or transgenic organisms (OVESNÁ 2005). GMO (Genetically Modified Organism) is according to law no. 78/2004 Sb. defined as organism, except human, whose heritable material was changed by genetic modification i.e. by targeted change of heritable material via technique which can not be achieved by nature way, for example crossing and breeding. This definition is referred to organisms able to reproduce or able to transfer of heritable material i.e. micro organisms, plants, animals and cell cultures, it is not referred to human (DRÁPAL *et al.* 2003). The transgenic plant should solve the tasks connected with the need of quick increasing of agri-production, which are closely connected with the increasing human population. The next task, with whose solution they are able to help, is annual wastage of yield associated with insect or diseases infestation because the amount of chemicals used for the plant protection is not able to increase permanently appearance to environmental implication. The main aim of genetic modifications is to affect the plant genome in order to create organisms that are resistant to herbicides, proof against to pest, bacteria, fungi and virus infection, extreme condition or for increasing of nutrition value of food (ZDEŇKOVÁ *et al.* 2004). However, the modern biotechnology evokes the row of ethical, environmental, social as well as health apprehension. The reason is especially fact that it involves an entirely new technology with the unknown impacts connected with their use. In order to introduce GM plants to cultivation and GMO products to the market, they have to be detailed tested in respect of negative impact to human and animal's health and they have to be visibly marked as transgene (ONDŘEJ 2002). In the European Union, there have to be marked food and food additives containing GMO product over the limit 0.9 per cent. These legislative limits for threshold value are different across the world (LEIMANS *et al.* 2006, ŽEL *et al.* 2005). For example in Norway and Hungary there is the threshold limit 2 per cent of GMO, in Switzerland 1 per cent (MEYER 1999, PÖPPING 2001) in many of Asian countries the threshold limit is 5 per cent and the requirement of notation is not required in USA where the GMO products are regard as equivalent of conventional food (LEIMANIS *et al.* 2006). The need of tracing and controlling of GMO presence and its content in agricultural crop and products has established the request to analytical methods that are able to detect, identify and quantify DNA insertion or exprimed protein in transgenic plants (BONFINI *et al.* 2001).



## 2. AIMS OF THE THESIS

I was interested in the study of possibility of molecular markers usage in potato. The main aim of this study was the application of molecular markers based on PCR (Polymerase Chain Reaction) for unambiguously determination of individual potato variety registered in the Czech Republic by different molecular markers chosen from widely recommended (Random Amplified Polymorphic DNA, Amplified Fragment Length Polymorphism, microsatellites analyses). The other aim was to develop the molecular markers based on PCR for GMO detection and quantification.

The main task was to make up the set of suitable molecular markers for potato variety identification and together with set of morphological and other biochemical markers make up the database for the professional public. The most important question were if Simple Sequence Repeats, Inter Single Sequence Repeat, Amplified Fragment Length Polymorphism and retrotransposone based markers are the suitable tools for potato variety identification and if these tools are utilizable for wide range of registered varieties in Czech Republic.

The second task was to optimise the fast and cheap method based on PCR technique for detection and quantification of GMO in potato. According to the literature knowledge I was concerned to the multiplex or more precisely duplex PCR as a tool for GMO detection and to the Real – Time PCR as a tool for GMO quantification.

### 3. LITERATURE REVIEW

#### 3.1. General Background

The opinions on the potato origin are different, most of authors concur that the cultural tetraploid forms originated from wild potato forms by crossbreeding and mutation in the Middle and South America and Mexico.

In the botanical system, potato belong to the family *Solanaceae*, genus *Solanum* contains about 2000 species. More than 200 species of them make tubers and 26 of them are cultural. Genus *Solanum* is composed of several sections, important is section *Tuberarium* that contains in 32 series large scale of species. Series *Tuberosa*, *Andigena*, *Acaulia* and *Demissa* have the breeding importance (ŽUKOVSKIJ 1971). Most expanded and the greatest economic importance have polymorphic cultural species *Solanum tuberosum* and *Solanum andigenum*. These species that form tubers have different level of polymorphism and they build polyploid series with the basic chromosome number  $x = 12$ .

Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is the important basic crop widely used for livestock feeding and industrial processing as feedstock for many industrial and food applications worldwide. The potato is currently grown worldwide mostly in temperate, subtropical and exceptionally in tropical climates. Importance of potato as food and feed crops is large and its use value is continuously improved. The potato producers almost doubled the amount of calories per hectare as rice or wheat from beginning of 20<sup>th</sup> century (POEHLMAN & SLEEPER, 1995) and the tubers possess high quantities of starch (15-25 % of total mass). Potato is rich in several micronutrients, especially vitamin C (13 mg per 100 g dry weight) and a single one medium sized potato of 150 g provides nearly half the daily adult requirement. The potato is a moderate source of iron (0.31 mg per 100g dry weight) and its high vitamin C content promotes iron absorption. Potato contains 20.13 g carbohydrates, 1.87 g proteins, 1.8 g fibre, 0.1 g fat, 379 mg of potassium, 44 mg of phosphorus, 5 mg of calcium, 1.44 mg of niacine, 0.106 mg of thiamine and 0.02 mg of riboflavine per 100 g of dry weight. It is exceeded only by rice, wheat and corn in terms of total food production. Potato is the most important non-cereal crop in the world and the world production reached a record 320 million tones in 2007 (FAO 2008). In addition, potato produces more energy and protein per unit of land than any other single food crop (BAJAJ 1987). The harvested area of table potato was 966 thousand of ha and production was 35,839 thousand of tons in EU 15. In the Czech Republic the whole production of potato was 997.7 thousand of tons on 40,244 ha in 2007 (ŽIŽKA 2007). There were processed

149.6 thousand of tons of potato for production of starch. The average yield of potato for starch production was 33 t.ha<sup>-1</sup> with the starch content 18.86 % and there were produced 32692 tons of potato starch. Almost the same situation was in the year 2008 (40.2 thousand of ha and 998 thousand of tons) (ŽIŽKA 2007).

The way of potato to conquer the World and its dissemination is interesting. In spite of the Middle and South American potato origin, the potato breeding has most extended on the North Hemisphere. Potatoes get to Europe in beginning of second half of 16<sup>th</sup> century, partly through Spain (1565) and probably also through Ireland and England (1585). Potato appeared in mansion, monastic and botanical gardens in the late 16<sup>th</sup> century and it was cultivated as ornamental flowers for almost 200 year. As late as second half of 18<sup>th</sup> and early 19<sup>th</sup> century potato became an important foodstuff and later industrial feedstock too. Potato returned to American continent when Irish began to move to North America which was necessary due to famine and incomers took potato with them. The beginning of modern potato breeding coincide to years 1842-1847, the needfulness of breeding was induced by epidemic of late blight (*Phytophthora infestans*) in Ireland. This disease caused distinct decrease of harvest about 50-70 per cent. The solution was prospected in resistant types of potato. In North America were used genotypes from potato ancient homeland and gave rise to pink skin variety “Purple Chili” of which variety “Garnet Chili” was bred by self pollination. This variety was the original gene resource for breeding of the other varieties includes variety “Early Rose” (1861) that was also used in European breeding program. The next stimulus for new variety breeding was effort to find the resistant types to ingoing potato wart diseases or Black Scab (*Synchytrium endobioticum*) and the result was variety “Snow drop” (1870). The next field was the requirement to higher harvest and quality of tubers because potato became an important part of meals (GRAMAN 1995).

The potato growing was the most extended in the countries with progressive industrialization of industry in England, Germany and in the USA. It is possible to find the first marked output of breeders work in these countries. The first varieties of European potato breeding come from England; the largest distribution had variety “Victoria” (1856) and later millennium variety “Duke of York” (1900) which gave rise to variety “Erstling”. In Germany there were bred some excellent varieties, for example “Imperator” (1875) with the starch contain more than 18 per cent and varieties “Jubel” and “Daber” with the potato wart disease resistance and range of other important varieties, for example “Deodarda”, “Parnasia”, “Industria”. Varieties “Early Rose”, “Victoria” and “Daber” were used for new variety breeding concept and they were characterized by the excellent

morphological and physiological qualities (JELLIS & RICHARDSON 1987).

In the Czech Republic the potato breeding started evolve not earlier than after the 1<sup>st</sup> World War and it brought many good varieties. Until then have grown German varieties. The planting was produced in Valečov since 1869. The first variety created by selection was “Nolčovy rohlíčky” (1887) in the Czech Republic. The potato varieties were tested in Agricultural-Botanical Station in Tábor since 1894. There were established the first breeding stations in twenties, Institute for potato improvement Slapy u Tábora (1921), experimental station Valečov (1921), breeding station Keřkov (1923). Overall, it was in Keřkov selected 17 varieties, including famous variety „Keřkovské rohlíčky“. By the cross-breeding have been bred 59 varieties since 1927 - 2007. This station as the first in Czech Republic started the address breeding and selection on resistance against potato cyst nematodes (*Globodera*) (in 1967). Our first allowed cyst-resistant variety was „Klára“ (1986). The research institute for potato growing Havlíčkův Brod was established in 1923 (GRAMAN 1995) and breeding station Velhartice (1957). The breeding stations (Keřkov, Česká Bělá, Hrádek u Pacova, Velhartice, Vyklantice, Bystřice nad Pernštejnem and Neustupovské Otradovice) were incorporated to the research institute Havlíčkův Brod in 1977. At the beginning of 1988 Valečov was incorporated to the research institute too. In 1992 occurred in the context of privatization to the disestablishment of the breeding institutes and breeding stations created joint - stock companies (Sativa Keřkov a.s., Selektá Pacov a.s., Vesa Velhartice a.s. a Vysočina Vyklantice a.s.). Currently, in the “European Union common catalogue of varieties of agricultural plant species”, there is 1216 potato varieties registered crosswise European Union (Common catalogue of varieties of agricultural plant species 2008) and there is 161 potato varieties in “The Czech Republic national book of variety?” (ČERMÁK 2008).

In the modern breeding there were enforce the conception of varieties for mass production more than two decades. Nowadays, marked pressure and raising competition of foreign varieties have started, also as the effort for use of national varieties in foreign countries. They should afford optimal harvest by better using of supplied nutrients, higher genetically determined resistance to diseases and pest etc. The varieties have to fulfil the requirements to high level of quality index according to utility lines and traits coherent with mechanized production. For the practical breeding, there is important research knowledge especially from areas of the resistant breeding, the gene pool investigation including utilization of genotypes with different ploidy level, the advancement of new breeding methods and procedures as is usage of *in vitro* methods, gene manipulation, molecular marker approaches

of evaluated traits and characters (GRAMAN 1995). The conclusion of breeding effort are varieties with good genetic constitution that provides required high and stable harvest and excellent level of quality index of tubers in the suitable growing conditions. It is need to extend the base of gene pool for the breeding of new, more yielding and more superior varieties. The success of breeding program is dependent on the knowledge and the understanding of investigated material and its genetic diversity. Selected gene resources are than use as donors of new or improving traits. For the breeders it is pretty useful to be able to detect the requirement traits in very early stage of the breeding process (COOKE 1999).

As a breeding subject, potato has some significant characteristics. This crop is propagated vegetatively, thus any genotype can be maintained with all characteristics unchanged through clonal propagation. Over the way, commercial potato varieties are autotetraploid ( $2n = 4x = 48$ ) and breeding at this level is quite problematic. Crossing and selection of desirable genotypes on tetraploid level makes breeding process difficult and time consuming. The improvement and creation of new varieties with new combinations of current traits or essentially new characters, such as GMO potatoes or conventional varieties with better parameters of quality or resistance to biotic and abiotic stressors are the main goals of plant breeding (CALLOW *et al.* 1997).

New crop varieties are developed by applying traditional breeding methods rely on random genome modification. It goes mainly about cross breeding of traditional varieties with the gene resources. These varieties combine multiple traits that support farm efficiency and acceptable yields but also contain genes associated with the production of toxins, allergens and antinutritional compounds that were not primarily monitored during the selection process. On the other hand, transgenic varieties developed by transformation of traditional variety are exactly determined because they are based on incorporation of exactly defined insert of donor organism to acceptor organism (ONDŘEJ 2002). The preparing and usage of these transgenic organisms is relatively new and frequently discussed field. A genetically modified organism (GMO) is a living organism, whose genetic composition has been altered by means of gene technology. The genetic modification usually involves insertion of DNA fragment, into the genome of the organism to be modified. This process is called transformation (ONDŘEJ 2002). Genetically modified (GM) or transgenic crops are now more often called "*Biotech crops*". Since 1996, the first year of commercialization of biotech crops, GM potatoes were cultivated in USA, Mexico and Canada and later in South Africa, China and India. The global area of all approved

biotech crops in 2008 was 125 million hectares. Remarkably, the global biotech crop area increased more than sixty-fold in the first eleven years of commercialization, making them the fastest adopted crop technology in recent history. In 2008, 25 countries grew biotech crops. The Czech Republic is one of the seven European Union countries where biotech crops are cultivated at present (CLIVE 2008). The most compelling case for biotechnology, and specifically biotech crops, is their capability to contribute to: increasing crop productivity and stability of productivity and production; conserving biodiversity, as a land-saving technology; the production of renewable resource based on the bio-fuels. In the field of genetic modification, potatoes make a suitable vegetable model for several reasons. They offer a relatively wide spectrum of markers and they allow preserve a pertinent marker for long time as a plant with vegetative propagation. Genetically modified potatoes were bred in order to increase resistance to pests, herbicides and influence of the environment (CALLOW *et al.* 1997).

### 3.2. Molecular Markers Techniques

Molecular markers in potato breeding are used for variety identification (GEBHARDT *et al.* 1989a), phylogenetic studies (KARDOLUS *et al.* 1997), analysis of recombination frequencies between genotypes (WILLIAMS *et al.* 1993), identification of genes for important agricultural traits (GEBHARDT 1994) and marker assisted selection (HAMALAINEN *et al.* 1997). The main goals of any breeding program there are transfer of valuable traits between distinct genotypes and selection of new combinations and recombinations. Molecular markers play an important role as tools for achieving these goals. The first step of this process is the identification of one or several candidate genes linked to a particular agronomical trait and also incorporation of these markers into the potato molecular map (BARONE 2004). The potato molecular map is one of the most saturated genetic maps, which allows for its extensive exploitation in the MMAS approach to potato breeding. The original map was constructed on the basis of segregation of RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markers (BONIEBALE *et al.* 1998; GEBHARDT *et al.* 1989b). The potato map is well saturated, contains more than 350 mapped markers almost evenly distributed across 12 potato chromosomes and covers approximately 90% of the potato genome (GEBHARDT *et al.* 1991). This high number of markers and genome coverage allows physical gene location: finding genes for particular agronomic traits. More than 25 genes with single dominance have been inserted into this map, some of them were identified as resistance genes and they are linked to QTL's-markers (Quantitative Trait Loci) yield and potato quality (BARONE 2004). The existence

of such a molecular map also allows carrying out positive selection in the breeding process. Known important agronomic genes include: self-incompatibility genes (GEBHARDT *et al.* 1991), the gene (*Dr*) responsible for mutant wilting phenotype (DE JUNG *et al.* 2001), genes controlling flower colour (VAN ECK *et al.* 1994), tuber colour (GEBHARDT *et al.* 1991), colour of tuber pulp (BONIEBALE *et al.* 1998), tuber shape (VAN ECK *et al.* 1994), leptine content (HUTVAGNER *et al.* 2001), and resistance genes (BONIEBALE *et al.* 1994, NIEWOHNER *et al.* 1995, YENCHO *et al.* 1996, HAMALAINEN *et al.* 1997, GEBHARDT & VALKONEN 2001, KUHLMANN *et al.* 2001, MARCZEWSKI *et al.* 2002). Not long ago, the Ultra High Density map (UDH) based on AFLP technology with more than 10,000 markers was constructed and this potato map is the densest map based on meiotic recombination in any species yet obtained (VAN OSSEN *et al.* 2006). For example there are another UDH maps: papaya 1501 loci (MA *et al.* 2004), cotton 3347 loci (RONG *et al.* 2004), and sorghum 2512 loci (BOWERS *et al.* 2003). DNA markers are suitable for the detection of genetic diversity (PLASCHKE *et al.* 1995, KIM & WARD 1997, DAVILA *et al.* 1998).

### 3.2.1. RFLP

The molecular marker technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) is based on the variations in the length of DNA fragments produced by a specific restriction endonuclease from genomic DNAs of two or more individuals of a species (KAHL 2001). RFLP analysis use genomic DNA or cDNA clones as probes following restriction of the target DNA with a specific enzyme. This is a very effective way of revealing differences between genotypes and the large number of restriction enzyme/probe combinations are available and make RFLP analysis a powerful tool, which are also robust, producing repeatable results in different laboratories. RFLPs are co-dominant in nature. For identification, the use of multiple copy probes, either of random or known derivation, can be advantageous (LEE *et al.* 1996). GÖRG *et al.* (1992) were able to identify 122 out of 134 potato varieties using *Taq-I* restricted DNA and a multi-locus probe is known as GP-35. COOKE (1995) used repetitive oligonucleotides as probes, with the (GATA)<sub>n</sub> repeats, proving this system to be widely applicable. GÖRG *et al.* (1992) used the RFLP method to identify 136 tetraploid potato varieties. This method unambiguously discriminated 130 potato varieties. However, there are some difficulties associated with this approach, including the need for relatively large amounts of good quality DNA, the source and public availability of certain probes, the duration of time necessary for results to be produced and the fact that radioactive labelling of probes is widely used to reveal

the DNA profiles, which together undoubtedly place a limitation on its more routine use (MANDOLINO *et al.* 1996).

### 3.2.2. PCR and PCR Based Techniques

Amplification techniques based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) overcome some of these difficulties and offer apparent advantages over RFLP. PCR is a method that allows the production of millions copies particular pieces of DNA, thus facilitating their analysis (WEISING *et al.* 1995). Arbitrary chosen primers have been shown to act as templates for the amplification of several fragments of genomic DNA, which led to the development of the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and AP-PCR (Arbitrarily Primed – PCR) techniques (WELSH & MCCLELLAND 1990). There has been a huge interest in these methods for variety discrimination and identification, with reports of their use in well over 75 different plant species, including all of the widely grown cereal, oilseed, tuber and root crops, and also fruit, vegetables and ornamental species (ROUT *et al.* 2006, BARCACCIA *et al.* 2003, RAFALSKI 2002).

#### 3.2.2.1. RAPD

RAPD analysis result in faster identification, because it need relatively little target DNA, avoid the use of radioactivity, require no prior knowledge of the DNA sequence of interest and use readily commercial available materials. Thus, RAPDs detect polymorphisms distributed throughout the genome with a primer amplifying several bands, each probably originating from a different locus. The concern has arisen more recently, however, about the reproducibility of RAPD profiles, especially between laboratories. RAPD technology is very quick and easy to develop, but lacks reproducibility (JONES *et al.* 1997, KARP *et al.* 1997). CHAKRABARTI *et al.* (2006) found that the RAPD profiles obtained from different types of tissue might differ even in the same potato variety. They observed the influence of random primers on the uniformity of RAPD fingerprints developed from different tissues of a particular variety. This problem is more serious in case of greenhouse or field grown samples. While this fact not necessarily be an insurmountable problem in the verification context it would cause major difficulties for the production of databases and international comparisons. Thus, it seems unlikely that RAPD will be the profiling method of choice for most applications in seed and variety testing work. In the last decade, RAPD markers have been used for the characterization of potato varieties in North America (SOSINSKI & DOUCHES



1996) Russia (ORGANISYAN *et al.* 1996), Japan (HOSAKA *et al.* 1994), Australia (FORD & TAYLOR 1997), Canada (DEMEKE *et al.* 1993) and India (CHAKRABARTI *et al.* 1998, 2001; PATTANAYAK *et al.* 2002). RAPD technique is very often used to study the genetic diversity or to manage the germplasm banks (DUARTE *et al.* 1999, GALVÁN *et al.* 2001).

#### 3.2.2.2. AFLP

The Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique combines principles of RFLP analysis with PCR technology (VOS *et al.* 1995). Total genomic DNA is digested with two restriction enzymes. Adaptors of known sequence are then ligated to the DNA fragments. Primers complementary to the adaptors, with additional 1-3 selective nucleotides on the 3'-end, are used to amplify the restriction fragments. The PCR amplified fragments can then be separated by gel electrophoresis and the banding patterns visualized. A range of enzymes and primers are available to manipulate the complexity of AFLP fingerprints to suit the application. The care is needed in the selection of primers with selective bases. AFLP profiles require no prior DNA sequence information and the number and nature of amplified fragments are altered by the choice of primer pair. The technique also has the advantage of sampling many loci simultaneously and, in addition, it is more robust than arbitrary priming techniques such as RAPD, because more stringent conditions are used in the PCR. AFLP has predominantly been applied in genetic mapping studies (BALLVORA *et al.* 1995, BECKER *et al.* 1995, MEKSEM *et al.* 1995, VAN ECK *et al.* 1995). According to VAN ECK *et al.* (1995) the technique is semi-quantitative because the intensity of AFLP bands can be used to determine zygosity. AFLP has been used to analyze varieties of various species, including cereals, potatoes, sunflowers, Brassicas, beans and lentils (COOKE & REEVES 1998, LAW *et al.* 1998). AFLP analysis represents a very flexible approach, which has been used in potatoes (MILBOURNE *et al.* 1997). Many loci are sampled simultaneously, making AFLP profiles complex, which can make interpretation complicated. Again, most AFLP analyses use radioactively labelled primers, which is both costly and inconvenient. However, there are some considerable advantages, many samples can be analyzed simultaneously, no knowledge of the DNA sequences is required and the flexibility of the approach makes it very powerful. The method is perhaps especially useful when large numbers of samples have to be compared. KARDOLUS *et al.* (1997) obtained highly informative DNA fingerprints using AFLP. Those analyses were generated using 19 taxa of *Solanum* sect. *Petota* (potatoes) and three taxa of *Solanum* sect. *lycopersicum* (tomatoes). AFLP fingerprints generated 12 to 71 scorable fragments per genotype. Although the chosen primer

combinations usually produce 150-300 scorable bands applicable in subsequent analyses (TRIBSCH *et al.* 2002) which was sufficient for taxonomical interpretation. VAN TREUREN *et al.* (2004) used AFLP analyses for collection management or, more precisely, for reduction of redundancy from a wild potato germplasm collection. In the set of 499 plants, 137 fragments were scored and 82 of these fragments were polymorphic. 97 different AFLP genotypes were observed among the 499 investigated individuals. No variation was observed within two potential duplication groups, whereas only limited differentiation among accessions was detected within seven groups, resulting in a total of 15 redundant accessions. MCGREGOR *et al.* (2002) used AFLP to analyze the wild potato germplasm of the series *Acaulia*. They analyzed 625 plants and scored 130 polymorphic bands. They re-classified some samples on the basis of AFLP analyses. VAN DEN BERG *et al.* (2002) used this method for analyses of the wild potato germplasm of the section *Petota* series *Longipedicellata*. They analyzed a set of three species, *S. polytrichon*, *S. hjertingii* and *S. stoloniferum*. Catalogue of AFLP markers was recently created as result of intensive studies and AFLP based approach in potato genomics. The catalogue is comprised of AFLP fingerprint images of 733 chromosome specific AFLP markers which are mapped relative to 220 RFLP loci, isozyme loci, morphological characteristics and disease resistant traits. Images of AFLP fingerprints combined with detailed information on the genomic location of all AFLP markers are available at <http://www.spg.wau.nl/pv/aflp/catalog.htm> (VAN DER VOORT *et al.* 1998).

### 3.2.2.3. SSR

Highly repetitive satellite DNA sequences are main components of heterochromatin in higher eukaryotic genomes. Microsatellites are considered as any one of a series of very short, middle repetitive, tandemly arranged, highly variable (hyper variable) DNA sequences are dispersed throughout fungal, plant, animal and human genomes (KAHL 2001). The PCR-based analysis of Simple Sequence Repeats (SSRs) may also prove to be very useful for variety identification and verification work. Microsatellites are tandemly repeated DNA sequences, usually with a repeat unit of 2- 4 base pairs (MORGANTE & OLIVIERI 1993). The di-, tri- or tetranucleotide repeats are arranged in tandem arrays consisting of 5 – 50 copies. SSR alleles, amplified products of variable length, can be separated by gel electrophoresis and visualized by silver-staining, autoradiography (if primers are radioactively labelled) or via automation (if primers are fluorescently labelled). SSR analysis is amenable to automation and multiplexing, and allows genotyping to be performed on large numbers of lines, and multiple loci to be analyzed simultaneously (COOKE & REEVES 1998). In many

species, multiple alleles have been shown to exist for some microsatellites, due to variations in the copy number of this repeat unit. In order to develop Sequence-Tagged Site Microsatellites (STSM), information about the sequence of the DNA flanking the microsatellite is needed. This information can sometimes be acquired from existing DNA sequence databases, but otherwise has to be obtained empirically. The frequency of SSR loci between mammals and plants are five times more frequent in the former (LAGERCRANTZ *et al.* 1993). In plants SSRs are occurring on average every 6 – 60 kb (CARDLE *et al.* 2000, WANG *et al.* 1994), the frequency is approximately one every 21.2 kb in dicots and every 64.6 kb in monocots (WANG *et al.* 1994). In potato, ASHKENAZI *et al.* (2001) estimated that one SSR could be found every 52 kb upon screening for five different motifs. This relatively low frequency of SSRs constituted one of the major drawbacks in early SSR development, as the number of microsatellites found by sequencing libraries made the cost per marker very expensive (RAFALSKI & TINGEY 1993). The first SSRs were developed by screening large numbers of clones from genomic libraries with repetitive probes (AKKAYA *et al.* 1992, RÖDER *et al.* 1995, BRYAN *et al.* 1997). To overcome this constraint, processes were designed to enrich libraries for microsatellite motives prior to screening, such as by hybridization to repetitive oligos bound to magnetic beads (KIJAS *et al.* 1994) or membranes (EDWARDS *et al.* 1996), triplex affinity capture (MILBOURNE *et al.* 1998), or selective pre-amplification using oligos with repeat motives (BRYAN *et al.* 1997). More practical, economical, and straightforward approach for species with reasonable DNA sequence database representation is a database search for SSR sequences, for example <http://www.potgenebank.org/>, <http://www.tigr.org/>, GenBank or EMBL (European Molecular Biology Laboratory). The potential of STMS analysis for plant breeding and variety related work in general has generated much research activity and, as a result, there are now microsatellites available for several crop species, including wheat, barley, maize, oilseed rape and other Brassicas, sunflowers, soybean, sugar beet, sweet potato, grapes, tomatoes, yams, citrus fruits and some ornamentals (KARP *et al.* 1997, WEISING *et al.* 1998, COOKE & REEVES 1998). Methods have been published for high throughput, non-radioactive detection of microsatellite alleles (VAN DEN BERG 1997, LAGODA *et al.* 1998). The data from STSM analyses are generally easy to score. A further significant advantage is that microsatellites can be multiplexed, so that a number of markers (loci) can be evaluated in a single PCR and separated on the same gel. This is not only more efficient, but is also suitable for automation, which both enhances the data gathering process and improves cost-effectiveness. Methods of STSM analyses, based on the differential fluorescent labelling

of microsatellite primers and separation of multiplexed products using automated DNA sequencer, are being increasingly used for crop plant genotyping (MITCHELL *et al.* 1997). The use of multiple array capillary electrophoresis for the rapid (<60 minutes) separation of multiplexed microsatellite products has also been demonstrated (MANSFIELD *et al.* 1998). Such approaches, although requiring expensive capital investment, have considerable potential for very efficient and automated profiling, database production and variety verification, and their wider use will prove difficult to resist. DNA-based fingerprinting using SSRs has been well established to effectively discriminate between tetraploid potato clones (KAWCHUK *et al.* 1996, PROVAN *et al.* 1996, SCHNEIDER & DOUCHES 1997, GHISLAIN *et al.* 2000, MCGREGOR *et al.* 2000, ASHKENAZI *et al.* 2001). SSRs can provide a reliable, efficient, and applied DNA-based fingerprinting system for potato. In potatoes, STSM have been used in North American and European varieties (PROVAN *et al.* 1996, KAWCHUK *et al.* 1996, SCHNEIDER & DOUCHES 1997). The primer pairs have been derived from the EMBL database and include some from tomatoes. In many cases, a primer pair amplifies a single microsatellite locus, making the data easy to interpret. Other primer pairs amplify multiple loci and can be useful for identification and classification. Multiple alleles also exist for some loci, which again is useful for identification (COOKE 1999). COOMBS *et al.* (2004) applied the DNA amplification pattern of 18 SSR primer combinations for identification of 17 varieties. Polymorphism was observed with 14 of the SSRs using agarose gel electrophoresis and PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) with all 18 SSRs; PAGE resolved between 2 – 12 DNA fragments, while agarose gel electrophoresis resolved between 2 – 7 fragments. No single SSR primer pair discriminated the panel of the 17 varieties using PAGE or agarose gel electrophoresis. All 17 varieties were discriminated on PAGE with various combinations of two primer pairs. GHISLAIN *et al.* (2000) used 18 microsatellites from 70 tested, for germplasm fingerprinting. The reference microsatellites were also used to suggest possible misclassifications in the germplasm collection as a PGI (Potato Genetic Identification) kit for routinely tools for true-to-type reference for each new entry samples. GHISLAIN *et al.* (2004) used 156 SSR primers for testing SSR conservation among *Solanum tuberosum* variety groups. There were 130 SSR primers generated amplification products in a large set of cultivated potato accessions comprised of at least four genotypes from each of the eight variety groups of *S. tuberosum*. Of the 156 SSRs tested, 22 were found to be most useful for germplasm fingerprinting. A group of 18 can be recommended as the most informative for genotyping cultivated potatoes, based on quality criteria, genome coverage, and locus-specific information content. The SSR technique was also modified using different primer

design; Inter Single Sequence Repeat (ISSR) markers/technique is such a modification of microsatellite analysis. ISSR amplification uses SSR primers (anchored or no anchored) to amplify DNA sequences between two inverted SSRs made up of the same sequence. This method was first used by ZIETKIEWICS *et al.* (1994) to rapidly differentiate between closely related individuals. One of the advantages of this technique is that there is no need of prior knowledge of the genome sequence. BORNET & BRANCHARD (2001), HANTULA *et al.* (1996), CHARTERS *et al.* (1996), and ZIETKIEWICS *et al.* (1994) found this method to be more reliable and repeatable than RAPD analysis and ISSR technique provides higher polymorphism. This technique is more rapid and less time-, labour- and financially consuming than AFLP or SSR. The character of ISSR markers is dominant, although some authors reported the presence of codominant markers (FISCHER *et al.* 1996). ISSR technique was successfully applied to study of genetic diversity in plants such as corn (KANTETY *et al.* 1995), rice (VIRK *et al.* 2000). BORNET *et al.* (2002) used ISSR method for detection of genetic diversity in 24 European and 4 Argentine cultivated potatoes. In this study they were able to identify all 28 varieties in 5 clusters and the difference between European and Argentine varieties was evident.

#### 3.2.2.4. Transposones and Retrotransposones

McClintock detected the presence of transposable elements in maize (*Zea mays* L.) in 1950. Transposable elements are useful molecular genetic tools for mutating and identifying genes, and a large number of genes have been isolated by using endogenous transposones as tags (WALBOT 1992). Transposable elements can be categorized into two major classes, DNA type transposable elements and retrotransposones. DNA-type transposable elements include the well-characterized Ac/Ds (Activator/Dissociation) (FREOROFF *et al.* 1983, DÖRING *et al.* 1984, SUTTON *et al.* 1984), En/Spm (Enhancer/Suppressor-mutator) (PEREIRA *et al.* 1985; MASSON *et al.* 1987) and Mu (Mutator) (ALLEMAN & FREELING 1986, LISCH 2002). While a DNA-type transposable element transposes through self-excision and subsequent re-insertion, a retrotransposon transposes after it is transcribed and reverse-transcribed, by means of a copy-and-paste mechanism (BOEKE & CORCES 1989). Retrotransposones consist of two subclasses of elements, Long-Terminal Repeat (LTR) and non-LTR retrotransposones, and the former are further subdivided into two groups – Ty1/*copia* type and Ty3/*gypsy* type (XIONG & EICKBUSCH 1990). Ty1/*copia* LTR retrotransposones contain Open Reading Frames (ORFs)

corresponding to retroviral *gag* and *pol* genes and have functional domains in *pol* ordered protease (PR), integrase (in), RNA-dependent DNA polymerase (RT) and RNase H (RH). Mobile genetic element retrotransposones generally show widespread chromosomal dispersion, variable copy number and random distribution in the genome (KUMAR *et al.* 1997, KALENDAR *et al.* 1999). Retrotransposones are the most common class of eukaryotic transposable elements. Retrotransposones move to new chromosomal locations via an RNA intermediate and insert new cDNA copies back into the genome (BOEKE *et al.* 1985, BINGHAM & ZACHAR 1989, FINNEGAN 1989). This mode of replication increases genome size and contributes significantly to the total DNA of higher plants, e.g. 50% of the maize genome is composed of retrotransposones (SHIRASU *et al.* 2000). To extend the transposones tagging strategy to plant species in which endogenous transposable elements have not yet been isolated, transformation techniques can be employed to introduce one of the characterized transposable elements (HARING *et al.* 1991). However, these tools were initially available only in a limited number of species with active endogenous transposable elements. The dispersion (KATSIOTIS *et al.* 1996, SUONIEMI *et al.* 1996), ubiquity (FLAVELL *et al.* 1992, VOYTAS *et al.* 1992) and prevalence (PEARCE *et al.* 1996, 1997) of retrotransposon-like elements in plant genomes can be exploited for DNA-fingerprinting. Two DNA techniques based on retrotransposon like elements were introduced by KALENDAR *et al.* (1999). REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) is a method based on polymerase chain reaction-mediated amplification of the region between a long terminal repeat of a retrotransposon and a nearby microsatellite (KAHL 2001). IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) markers are generated by the proximity of two retrotransposon using outward facing primers annealing to their long terminal repeats (LTRs) (KALENDAR *et al.* 1999). Application of IRAP and REMAP have been demonstrated to provide suitably polymorphic markers for variety identification or breeding purposes (KALENDAR *et al.* 1999, MANNINEN *et al.* 2000, VICIENT *et al.* 2001, BOYKO *et al.* 2002). RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) is a four-primer technique that will amplify two bands from the 5' and 3' ends of a retrotransposon, if this is present, or a single band if the retrotransposon is absent. This technique requires knowledge of the genomic DNA region surrounding the retrotransposon, and allows analysis of a single locus at a time, but is designed in such a way as to include an internal control system, and is the only one which allows clear identification of heterozygotes (FLAVELL *et al.* 1998). This method was used by FLAVELL *et al.* (2001) for pea, by VITTE *et al.* (2004) for rice and by BEŽO *et al.* (2006) for potato and flax. Alternatively, retrotransposones can be used in an AFLP-type

reaction (VOS *et al.* 1995), called Sequence-Specific Amplified Polymorphism SSAP (WAUGH *et al.* 1997). In the SSAP technique, the selective bases added to the primers reduced the complexity of the amplified DNA, depending on the copy number of the retrotransposon targets. The use of SSAP has been described for barley (WAUGH *et al.* 1997), wheat (GRIBBON *et al.* 1999), pea (ELLIS *et al.* 1998) and alfalfa (PORCEDDU *et al.* 2002).

### 3.3. Molecular Marker Assisted Selection

MMAS is one of the most efficient applications of biotechnology to plant breeding because it does not require DNA manipulations but only resides in the analysis of natural DNA variations that occur after intercrossing different genotypes. The application of MMAS to the introgression of genes from donor genotype to the recurrent genotype through a backcross breeding scheme clearly points out the great advantages of the molecular markers use for improving the cultivated varieties, as described by TANKSLEY *et al.* (1989). The theoretical model proposed by tomato breeding states that 99% of the cultivated genome can be recovered with only three backcross generations using MMAS, instead of the six or seven generations required to recover the same percentage of genome without the use of molecular markers. The advantages due to the use of molecular markers can be ascribed to either "positive" or "negative" selection applied during trait introgression from the wild to the cultivated gene pool (BARONE 2004). To date genetic maps, constructed by the usage of molecular markers, are available for many crop species, including tomato, potato, cereals, legumes. The linkage between molecular markers and various traits has been observed and MMAS is widely used to select superior genotypes for breeding (MOHAN *et al.* 1997). The application of molecular markers in potato breeding is reported for many purposes. In breeding programs aimed to transfer useful genes between different species with the aid of molecular markers, is the first step the identification of one or more markers linked to the gene(s) to be introgressed and their localization on the molecular map. Currently, the potato maps are one of the most highly saturated maps with different molecular markers, and it therefore provides extensive opportunities for optimal use of DNA analysis for MMAS. The existence of this highly saturated potato maps allow many genes to be localized on the 12 potato chromosomes, and markers linked to these genes can be used to perform positive assisted selection. The first localized gene on the map was *Gro1* (BARONE *et al.* 1990), the gene that confers resistance to pathotype Ro1 of the nematode *Globodera rostochiensis*. Many other genes have been mapped, including the self-incompatibility gene

(GEBHARDT *et al.* 1991), the gene (*Dr*) determining the droopy mutant phenotype (DE JUNG *et al.* 2001), three genes for flower colour determination (VAN ECK *et al.* 1993), and some single loci controlling tuber traits such as skin colour (GEBHARDT *et al.* 2001), flesh colour (BONIERBALE *et al.* 1998), tuber shape (VAN ECK *et al.* 1994), and leptin content (HUTVAGNER *et al.* 2001). Indeed, most of mapping work was finalized to map resistance genes to various pathogens. Actually, there are 22 single dominant genes (*R* genes) localized on 10 chromosomes. Two more resistance genes have been mapped: the gene *Rp11* confers resistance to *Phytophthora infestans* and maps on chromosome VII (KUHL *et al.* 2001) and the gene *Ns* for resistance to PVS (Potato Virus S), that is localized on chromosome VIII (MARCZEWSKI *et al.* 2002). In addition, some genes that control quantitative resistance traits or yield and tuber quality were mapped as QTLs (Quantitative Trait Loci). Amongst QTLs involved in resistance to biotic stresses, the first mapped were those conferring resistance to insects (BONIERBALE *et al.* 1994, YENCHO *et al.* 1996). Afterwards, other QTLs for resistance to various pathogens were mapped, involved in resistance to *Phytophthora infestans*, *Erwinia carotovora* and *Globodera spp.* as reported by GEBHARDT & VALKONEN (2001), and to PLRV (Potato Leaf Roll Virus) (MARCZEWSKI *et al.* 2001). As for tuber characteristics, these are mostly polygenic traits and a lot of mapping work has been carried out by various researchers to localize the related QTLs on the potato map, using different segregating progenies and marker systems. Negative assisted selection was successfully applied in potato to a backcross breeding scheme. In backcross breeding programs the use of molecular markers has also been demonstrated high efficient reduce of the wild genome content and linkage drag around the introgressed gene. When the aim of backcrossing is to transfer genes from the wild to the cultivated species, species-specific molecular markers are excellent tools to select against the donor genome, thus speeding up the recovery of recurrent genome (HOSPITAL *et al.* 1992). It is well known that, following a backcross between diploid cultivated and wild related species, the wild genome content as a mean value is reduced to one half at each backcross generation. This estimation could be greatly different from what really occurs in potato breeding, where the introgression of useful traits from wild to cultivated species often involves crosses between species at different ploidy level. The consequence is that, at each backcross generation, hybrids with variable aneuploid/euploid level are obtained, for which the prediction of the wild genome content still retained is not so feasible. Especially in these cases the use of wild species-specific molecular markers can raise the efficiency of wild genome reduction, since they allow the wild genome content to be widely estimated at genotypic rather than phenotypic level. The most suitable



markers for this purpose are the AFLPs that give a relatively high number of informative markers per reaction (RUSSELL *et al.* 1997), and can therefore allow a higher proportion of wild genome to be monitored at each backcross generation through the analysis of many donor-specific markers contemporaneously.

### 3.4. GMO Detection and Quantification

The rapid development of biotechnology has launched introducing of genetically modified plants (GMPs) and GMPs derived products into the environment and market. Since the techniques for plant transformation were established, tested and optimised, a wide range of applications have been investigated and performed to solve existing problems of the agriculture. Genetic modification of plants has thus been used to enhance natural plant resistance to pests and diseases or to introduce foreign DNA sequences with similar effects. GMO and GMO products were introduced into agricultural practice in early 1990s. According to ISAAA, 13.3 million farmers in record 25 countries planted 125 million hectares of biotech crops (the modern name for the GMO) last year. Among the biggest growers of GMO worldwide belongs traditionally USA. In 2006, there were GMO produced on 54.6 mio of ha in USA, follows Argentina with 18 mio ha, Brazil 11.5 mio ha, Canada 6.1 mio ha, India 3.8 mio ha and China 3.5 mio ha (CLIVE 2008). Genetically modified organisms (GMO, transgenic organisms) have become a real part of our lives and are being introduced to the human food chain. GMOs entered the European food market in 1996. The first product appeared on UK was a genetically modified tomato puree. This product was clearly labelled because it was anticipated the European Commission's Novel Food Regulation (EC) No 258/97 (European Commission, 1997), under which products containing GMOs must be labelled if they differ substantially from their conventional counterpart, either by composition, nutritional value or nutritional effects for the intended use of the food. For this purpose, qualitative methods for detection of GMOs are required. It is likewise important to investigate whether the GMO found is authorised or not; consequently, specific methods for identification of GMOs are needed. The labelling regulation was amended two years later by fixing a threshold of 1 % for adventitious contamination of GM-material in a non-GM background (EC) No 49/2000 (European Commission, 2000). In order to determine whether a food product (on an ingredient level) contains more than 1 % GMOs (for which labelling becomes mandatory) quantitative analytical methods are necessary. Because of GMO character and occasions combine the genetically information from

the different organisms, the treatment with GMO is strong regulated (OVESNÁ 2005). In the Czech Republic is the treatment with GMO treated by law No. 78/2004 Sb. about the treatment with GMO and GMO products. The force of these law is from 25.2.2004 and replaces the law 153/2000 Sb.. 13.9.2005 entered into the force the amendment of law no. 78/2004 Sb. about the treatment with GMO and GMO products – the law no. 346/2005 Sb.. This law, in principle, duplicates the direction EU 2001/18/EC. The main aim is cover of safety treatment with GMO without the baleful impacts to health of human and animals, environment and biodiversity, without causing unnecessary obstruction. The law gives sureness to the citizens that the treatment with GMO and its using is under the professional control. It provides public information in the field of GMO too (ONDŘEJ & DROBNÍK 2002). Important obligation in the international field is presented by CBP (Cartagen Protocol about the Biological safety), which was accepted in January 2000 in Montreal, Canada and came into force 11.9.2003 as the first and at to now single protocol to Stipulation about the biological diversity. The Czech Republic is required to keep a row of EU regulations that are regard to food chain. Thus, it has to provide for GMO control in the food chain and its correct labelling (OVESNÁ *et al.* 2005). In the Czech Republic there are the laboratories that are members of European Network of GMO Laboratories (ENGL). The reference laboratory is the RL GMO, VURV Ruzyně. In the field of genetic modification, potatoes make a suitable vegetable model for several reasons. From a practical viewpoint they offer a relatively broad spectrum of markers and as a plant with vegetative propagation they can preserve a respective marker for quite a long time. On the other hand, their particular disadvantages are following: low levels of inserted genes expression, difficult regeneration of transformed plants out of sterile environment and morphological alterations, such as on the tubers (DAVIES 1996). Genetically modified potatoes were bred with the purpose to increase their resistance to pests, herbicides and harmful effects of the environment, to improve nutritional qualities or to even produce substances that have great importance for human medicine, such as their potential application as vaccines for the stimulation of immunity against variola. Modified potatoes producing substances utilizable in food and chemical industry also represent an important group (SLATER *et al.* 2003). The regulation of appearance of pathogens and pests is the problem of many growers worldwide. *Leptinospora decemlinety*, PLRV a Y virus are one of the most devastate pathogens caused damage on yield up to 90 per cent in attacked plant (PALUCHA *et al.* 1998). The most of genetically modified potatoes were made up to increase their endurance to pathogens, pests, pesticides, herbicides and demanding impacts of environment

(PŘIBYLOVÁ 2006). There were transformed the lines of potato by gene *Cry3A* from *Bacillus thuringiensis* for control of *Leptinospora decemlineata* (PŘIBYLOVÁ 2006), by gene *GNA* from *Galanthus nivalis* with the insecticide effect based on worsening of insects develop and decreasing of their fertility (GATHOUSE *et al.* 1997). To induce resistance to *Phytophthora infestans* the gene for temporin A was introduced to potato (OSUSKY *et al.* 2004). LYAPKOVA *et al.* (2001) performed transformation of potatoes (variety Desirée) by use of vector pH22Kneo (DE BOLLE *et al.* 1993) encoding an antimicrobial chitin-binding protein *ac2* from seeds of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.). This modification plays a role in the defence of potatoes against fungal infections. Protein produced by the expression of gene *ac2* is a member of the group of chitin-binding proteins (BROEKAERT *et al.* 1992) that are able to bind chitin in fungal cell walls, causing a consequent change in its polarity, and resulting in the inhibition of fungal growth (SELITRENNIKOFF 2001). Protection against the PLRV can be insertion of coat protein gene from PLRV to plant (VAN DER WILK *et al.* 1991). The potato, with the *bar* gene from bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, is resistant to phosphinotricine, efficient substance of herbicides (PADAGIMAS *et al.*, 1994). Because GMOs is a widely debated issue, it is necessary to set up effective mechanisms for its control, which will respond to the legislative requirements. There was developed a number of analytical methods, qualitative and quantitative, for reliable detection of the presence or the amount of GMOs in agricultural commodities. In addition, the classical methods for analyzing DNA and proteins, such as polymerase chain reaction (PCR) and ELISA may certain types of GMO detect by the complementary methods of chemical analysis such as chromatography and infrared spectroscopy (ANKLAM 2002). All these methods have certain restrictions, whether in their specificity, sensitivity, the possibility of affecting other contaminants, suitability of methods for the sampling time or cost-effectiveness determination (ZDEŇKOVÁ *et al.* 2004, PÖPPING, 2001). However, the methods vary in their reliability, robustness and reproducibility; in combination with different levels of cost, complexity, and speed etc. Moreover, there is no one method that is applicable to all circumstances. A further consideration is the claim of very high sensitivity reached in the analysis even in absence of clearly proven detailed performance studies. In order to obtain comparable results, and hence giving consumers and producers the confidence in the testing methods, there is an urgent need for internationally validated methods, which could serve as reference methods. To date, several methods have been validated at the European level, and the trend for such studies is increasing at the international level. Nevertheless, in order to be able to demonstrate that the results from the validated method are correct, control laboratories

should participate in proficiency testing, which is also a valuable step in the preparation for accreditation. The most of papers is focused on publication of detection protocols for genetically modified corn, soybean, rape, or cotton. Minor modification, such as in potatoes attracts little attention.

#### 4. REFERENCES

- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., CREGAN, P.B. (1992). Length polymorphism of simple sequence repeat DNA soybean. *Genetics* 132, 1131-1139.
- ALLEMAN, M., FREELING, M. (1986). The Mu transposable elements of maize: evidence for transposition and copy number regulation during development. *Genetics* 112, 107-119.
- ANKLAM, E., GADANI, F., HEINZE, P., PIJNENBURG H., VAN DEN EEDE G.(2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products, *Eu. Food Res. Technol.* 214, 3–26.
- ASHKENAZI, V., CHANI, E., LAVI, U., LEVY, D., HILLER, J., VEILLEUX, E. (2001). Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44, 50-62.
- BALLVORA, A., HESSELBACH, J., NIEWOHNER, J., LEISTER, D., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. (1995). Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 82-90.
- BARCACCIA, G., TAVOLETTI, S., MARIANI, A., VERONESI, F. (2003). Occurrence, inheritance and use of reproductive mutants in alfalfa improvement. *Euphytica* 133, 37-56.
- BARONE, A. (2004). Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Am. J. Potato Res.* 81, 111-117.
- BARONE, A., RITTER, E., SCHACHTSCHNABEL, U., DEBENER, T., SALAMINI, F. AND GEBHARDT, C. (1990) Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 224, 177–182.
- BECKER, J., HEUM, M. (1995). Barely microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* 27, 835-845.
- BEŽO, M., HRUBÍKOVÁ, K., ŠTEFANOVÁ, V., ŽIAROVSKÁ, J., BEŽO, M. ML, CANDRÁKOVÁ, A. (2006). Plant germplasm evaluation retrotransposons and microsatellites. *Biotechnology 2006*, (České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing).
- BINGHAM, P.M., ZACHAR, Z. (1989). Retrotransposons and FB elements from *Drosophila melanogaster*. In: *Mobile DNA* (ed) Berg DE, Howe MM, (Washington DC: American Society of Microbiology), pp.485-502.
- BOEKE, J.D., CORCES, V.G. (1989). Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 403-34.

- BOEKE, J.D., GARFINKEL, D.J., STYLES, C.A., FINK, G.R. (1985). Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40:491-434.
- BONFINI, L., HEINZE, P., KAY, S., VAN DER ERDE, G. (2001). Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission, Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection, Final report.
- BONIEBALE, M.W., PLAISTED, R.L., PINDELA, O., TANKSLEY, S.D. (1994). QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 87, 973-987.
- BONIEBALE, M.W., PLAISTED, R.L., TANKSLEY, S.D. (1998). RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120, 1095-1103.
- BORNET, B., GORAGUER, F., JOLY, G., BRANCHARD, M. (2002). Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45:481-484.
- BORNET, B., BRANCHARD, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 209-215.
- BOWERS, J.E., ABBEY, C., ANDERSON, S., CHANG, C., DRAYE, X., HOPPE, A.H. (2003). A high density genetic recombination map of sequence-tagged sites for *Sorghum*, as a framework for comparative structural and evolutionary genomics of tropical grasses. *Genetics* (2003) 165:367–386.
- BOYKO, E., KALENDAR, R., KORZUN, V., KOROL, A., SCHULMAN, A.H., GILLS, B.S. (2002). A high-density cytogenic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defence related genes: insight into cereal chromosome structure and function. *Plant. Mol. Biol.* 48, 767-790.
- BROEKAERT W.F., MARIEN W., TERRAS F.R., DE BOLLE M.F.C., PROOST P., VAN DAMME J., DILLEN L., CLAEYS M., REES S.B., VANDERLEYDEN J. (1992): Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine glycine-rich domain of chitinbinding proteins. *Biochemistry*, 31, 4308–4314.
- BRYAN, G.J., COLLINS, A.J., STEPHENSON, P., ORRY, A., SMITH, J.B., GALE, M.D. (1997). Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 4:557-563.
- CALLOW, J.A., FOED-LLOYD, B.V., NEWBURY, H.J. (1997). *Plant genetic resource-conservation and use.* (Wallingford CAB, UK).

- CARDLE, L., RAMSAY, L., MILBOURNE, D., MACAULAY, M., MARSHALL, D., WAUGH, R. (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156, 847-854.
- CHAKRABARTI, S.K., BIRHAM, R.K., PATTANAYAK, D. (1998). Identification and genetic similarity analysis of Indian potato cultivar by random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Indian J. Exp. Biol.* 37, 1123-1128.
- CHAKRABARTI, S.K., PATTANAYAK, D., NAIK, P.S. (2001). Fingerprinting Indian potato cultivars by random amplifies polymorphic DNA (RAPD) markers. *Potato Res.* 44, 375-387.
- CHAKRABARTI, S.K., PATTANAYAK, D., SARMA, D., CHIMOTE, V.P., NAIK, P.S. (2006). Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biol. Plantarum* 50, 531-536.
- CHARTERS, Y.M., ROBERTSON, A., WILKINSON, M.J., RAMSAY, G. (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Olifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* 92, 442-447.
- CLIVE, J. (2008). Highlights of the Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA Brief 39.
- COMMON CATALOGUE OF VARIETIES OF AGRICULTURAL PLANT SPECIES 2008. [http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/comcat\\_agri\\_2008/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/comcat_agri_2008/index_en.htm)
- COOKE, R.J. (1995). Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. *J. Chromat.* 698, 281-299.
- COOKE, R.J. (1999). Modern methods for cultivar verification and the transgenic plant challenge. *Seed Sci. Technol.* 27, 669-680.
- COOKE, R.J., REEVES, J.C. (1998). New approaches to potato variety identification. *Potato Res.* 42, 529-539.
- COOMBS, J.J., FRANK, L.M., DOUCHES, D.S. (2004). An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. *Am. J. Potato Res.* 81, 243-250.
- ČERMÁK, V. (2008). Přehled odrůd brambor 2008. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno. <http://www.ukzuz.cz>.
- DAVIES, H.V. (1996): Recent developments in our knowledge of potato transgenic biology. *Potato Research*, 39, 411-427.
- DAVILA, J.A., SANCHEZ DE LA HOZ, M.P., LORCE, Y., FERRER, E. (1998). The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficient of parentage to determine genetic relationship in barely. *Genome* 41, 477-486.

- DE BOLLE, M.F.C., OSBORN, R.W., GODERIS, I.J., NOE, L., ACLAND, D., HART, C., TORREKENS, S., LEUVEN, F.V., BROEKAERT, W.F.(1996). Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 31, (7): 993–1008.
- DE JUNG, H., KAWCHUK, L.M., COLEMAN, W.K., VERHAEGHE, C.A., RUSSEL, L., BURNS, V.J., TREMBLAY- DEVEAU, E. (2001). Development and characterization of an adapted form of Droppy, a diploid potato mutant deficient in abscisic acid. *Am. J. Potato Res.* 78, 279-290.
- DEMEKE, T., KAWCHUK, LM., LYNCH, D.R. (1993). Identification of potato cultivars and clonal variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Am. Pot. J.* 70, 561-569.
- DESBOROUGH, S., PHIOQUIN, S.J. (1968). Potato variety identification by use of electrophoretic parents of tuber proteins and enzymes. *Am. Pot. J.* 45, 220-229.
- DÖRING, H.P., TILLMANN, E., STARLINGER, P. (1984). DNA sequence of the maize transposable element Dissociation. *Nature* 307, 127-130.
- DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., HLÚBIK, P., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, M., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., ŠPELINA, V., WINKLEROVÁ, D. (2004). *Potraviny nového typu. Vědecký výbor pro potraviny, Státní zdravotní ústav, <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vvp.htm>*
- DUARTE, E. R., MELO, M. M., HAHN, R. C. & HAMDAN, J. S. (1999). Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. *Med Mycol* 37, 159–162.
- EDWARDS, K.J., BARKER, J.H.A., DAYL, A., JONES, C., KARP, A. (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequence in plants. *Biotechniques* 20, 758-760.
- ELLIS, T.H.N., TURNER, L., HELLENS, R.P., LEE, D., HARKER, C.L., ENARD, C., DOMONEY, C., DAVIES, D.R. (1998). Linkage maps in Pea. *Genetics* 130, 649-663.
- FINNEGAN, D.J. (1989). Eukaryotic transposable elements and evolution. *Trends Genet.* 5, 103-107.
- FISCHER, P.J., GARDNER, R.C., RICHARDSON, T.E. (1996). Single locus microsatellite isolation using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 4369-4371.
- FLAVELL, A.J., DUNABAR, E., ANDERSON, R., PEARCE, S.R., HARTLEY, R., KUMAR, A. (1992). Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res.* 20, 3639-3644.



- FLAVELL, A.J., KNOX, M.R., ELLIS, T.H.N. (2001). Marker analysis in *Pisum* using SSAP and RBIP genetic markers based on the PDR1 retrotransposon. Plant and Animal Genome, IX Conference, San Diego, California.
- FLAVELL, A.J., KNOX, M.R., PEARCE, S.R., ELLIS, T.H.N. (1998). Retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* 16, 643-650.
- FAO (2008). International year of potato 2008, FAO, Roma, Italy.
- FORD, R., TAYLOR, P.W.J. (1997). The application of RAPD markers for potato cultivar identification. *Aust. J. Agr. Res.* 48, 1213-1217.
- FREOROFF, N., WESSLER, S., SHURE, M. (1983). Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell* 35, 235-242.
- GALVÁN, M., AULICINO, M., GARCÍA MEDINA, S., AND BALATTI, P. (2001). Genetic diversity among northwestern Argentinian cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as revealed by RAPD markers. *Genet. Res. Crop. Evol.* 48: 251–260.
- GATEHOUSE, A.M.R., DAVISON, G.M., NEWELL, C.A., MERRYWEATHER, A., HAMILTON, W.D.O., BURGESS, E.P.J., GILBERT, R.J.C., GATEHOUSE, J.A. (1997). Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol.Breed* 3: 49–63.
- GEBGHARDT, C., BALLVORA, A., WALKENMEIER, B., OBERHAGEMANN, P., SCHILLER, K. (1994). Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol. Breed.* 13, 93-102.
- GEBHARDT, C., BLOMENDAHL, C., SCHACHTCHABEL, U., DEBENER, T., SALAMINI, F., RITTER, E. (1989a). Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) with RFLP fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 78, 16-22.
- GEBHARDT, C., RITTER, E., BARONE, A., DEBENER, T., WALKEMEIER, B., SCHACHTSCHABEL, U., KAUFMANN, H., THOMPSON, R.D., BONIERBALE, M.W., GANAL, M.W., TANKSLEY, S.D., SALAMINI, F. (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83, 49-57.
- GEBHARDT, C., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTCHABEL, U., WALKEMEIER, B., UHRAT, H., SALAMINI, F. (1989b). RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 78, 65-75.
- GEBHARDT, C., VALKONEN, J.P.T. (2001). Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Ann. Rev. Phytopatol.* 39, 79-102.

- GHISLAIN, M., RODRÍGUEZ, F., VILLAMÓN, F., NÚÑEZ, J., WAUGH, R., BONIERBALE, M. (2000). Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. Research on Potato, CIP Program Report 1999-2000, pp167-174.
- GHISLAIN, M., SPOONER, D.M., RODRÍGUEZ, F., VILLAMÓN, F., NÚÑEZ, J., VÁSQUEZ, C., WAUGH, R., BONIERBALE, M. (2004). Selection of highly informative and userfriendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 108, 881-890.
- GÖRG, R., SCHACHTSCHABEL, U., RITTER, E., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. (1992). Discrimination among 136 tetraploid potato variety by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Sci.* 32, 815-819.
- GRAMAN, J. (1995). Šlechtění zemědělských plodin, olejniny, technické plodiny, okopaniny. JU-ZF České Budějovice.
- GRIBBON, B.M., PEARCE, S.R., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H., PAULIN, L., JACK, P., KUMAR, A., FLAVELL, A.J. (1999). Phylogeny and transpositional activity of Ty1- copia group retrotransposons in cereal genomes. *Mol. Gen. Genet.* 261, 883–891.
- HAMALAINEN, J.H., WATANABE, K.N., VALKONEN, J.P.T., ARIHARA, A., PLAISTED, R.L., PEHU, E., MILLER, L., SLAK, S.A. (1997). Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* 94, 192-197.
- HANTULA, J., DUSABENYGASANI, M., HAMELIN, R.C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. Path.* 26, 159-166.
- HARING, M.A., ROMMENS, C.M.T., NIKAMP, H.J.J., HILLE, J. (1991). The use of transgenic plants to understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies. *Plant Mol. Biol.* 16, 449-461.
- HOSAKA, K., MORI, M., OGAWA, K. (1994). Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. *Am. Pot. J.* 71, 535-546.
- HOSPITAL, F., CHEVALET, C., MULSANT, P. (1992). Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132:1199–1210.
- HUTVAGNER, G., BANFALVI, Z., MILANKOVICS, I., ŠILHAVÝ, D., POLAGR, Z., HORVATH, S., WOLTERS, P., NAP, J.P. (2001). Molecular markers associated with leptine production are located on chromosome 1 in *Solanum chacoense*. *Theor. Appl. Genet.* 102, 1065-1071.
- JELLIS, G.J., RICHARDSON, D.E. (Eds) (1987). The production of new potato varieties. Technological advances. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 358 pp.

- JONES, C.J., EDWARDS, K.J., CASTAGLIONE, S., WINFIELD, M.O., SALA, C., VAN DE WIEL, BREDEMEIJER, G., VOSMAN, B., MATTHES, M., MALCEVSCHI, A., MARMIROLI, N., AERT, R., VOLCKAERT, G., RUEDA, J., LINAACERO, R., VAZQUE, A., KARP, A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plant by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3, 381-390.
- KAHL, G. (2001). *The dictionary of Gene Technology*. Wiley-VCH, Weinheim.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98, 704-711.
- KANTETY, R.V., ZENG, X.P., BENNETZEN, J.L., ZEHR, B.E. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1, 365-337.
- KARDOLUS, J.P., VAN ECK, B.J., VAN DEN BERG, R.G. (1997). The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 210, 87-103.
- KARP, A., EDWARDS, K.J., BRUFORD, M., FUNK, S., VOSMAN, B., MORGANTE, M., SEBERG, O., KREMER, A., BOURSOT, P., ARCTANDER, P., TAUTZ, D., HEWITT, G.M. (1997.) Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nat. Biotechnol.* 15,625-628.
- KATSIOTIS, A., SCHMIDT, T., HESLOP-HARRISON, J.S. (1996). Chromosomal and genomic organization of Ty1- copia-like retrotransposon sequences in the genus *Avena*. *Genome* 39:410-417.
- KAWCHUK, L.M., LUNCH, D.R., THOMAS, J., PENNER, B., SILLITO, D., KULCSAR, F. (1996). Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Am. Pot. J.* 73, 325-335.
- KIJAS J.M.H., FOWLER J.C.S., GAGBETT C.A., THOMAS M.R. (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 16, 656.
- KIM, H.S., WARD, R.W. (1997). Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. Theko.) based on RFLPs and coefficient of paternity. *Theor. Appl. Genet.* 94, 472-479.
- KUHL, J.S., HANNEMAN, R.E. JR, HAVEY, M.J. (2001). Characterization and mapping of Rpi 1, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol. Genet. Genomics* 265, 977-985.

- KUMAR, A., PEARCE, S.R., MCLEAN, K., HARRISON, G., HELOP-HARRISON, J.S., WAUGH, R., FLAVELL, A.J. (1997). The Ty1-copia group of retrotransposon in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100, 205-217.
- LAGERCRANTZ, U., ELLEGREN, H., ANDERSON, L. (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21, 1111-1115.
- LAGODA, P.J., DAMBIER, D., GRAPIN, A., LANAUD, C., NOYER, J.L. (1998). Nonradioactive sequence-tagged microsatellite site analysis: A Method transferable to the tropics. *Electrophoresis* 19, 152-157.
- LAW, J.R., DOMINI, P., KOEBNER, R.M.D., REEVES, J.C., COOKE, R.J. (1998). DNA profiling and plant variety registration. 3: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102, 335-342.
- LEE, D., REEVES, J.C., COOKE, R.J. (1996). DNA profiling and plant variety registration: 2. Restriction fragment length polymorphisms in varieties of oilseed rape. *Plant Varieties and Seeds* 9, 181-190.
- LEIMANIS, S., HERNANDEZ, M., FERNANDEZ, S., BOYER, F., BURHS, M., BRUDERE, S., GLOUDEN T., HARRIS, N., KAEPPEL, O., PHILIPP, P., PLAN, M., PUIGDOMENECH, P., VAITILINGOM, M., BERTHEAU, Y., REMACLE, J. (2006). A microarray based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant. Mol. Biol.* 61:123-139.
- LYAPKOVA, N. S., LOSKUTOVA, N. A., MAISURYAN, A. N., MAZIN, V. V., KORABLEVA, N. P., PLATONOVA, T. A., LADYZHENSKAYA, E. P., EVSYUNINA, A. S. (2001). Transformed Potato Plants Carrying the Gene of the Antifungal Peptide of *Amaranthus caudatus*. *Appl. Biochem. Microb.* 37, (3): 301–305.
- LISCH, D. (2002). Mutator transposons. *Trends Plant Sci.* 7, 498-504.
- MA, H., SHIEH, K., CHEN, G., QIAO, X.T, CHUANG, M. (2006). Application of Realtime Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2 (3).
- MANDOLINO, G., DE MARCO, S., FAETI, V., BAGATTA, M., CARBONI, A., RANALLI, P. (1996). Stability of fingerprints of *Solanum Tuberosum* plants derived from conventional tubers and microtubers. *Plant Breed.* 115, 439-444.
- MANNINEN, O., KALENDAR, R., ROBINSON, J., SCHULMAN, A.H. (2000). Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Mol. Gen. Genet.* 264, 325- 334.
- MANSFIELD, E.S., ROBERTSON, J.R., VANISE, M., ISENBERG, A.R., FRAZIER, R.R., FERGUSON, K., CHOW, S., HARTUS, D.W., BARKER, D.L., GILL, P.D., BUDOWLE, B., MCCORD, B.R.

- (1998). Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) system using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 101-107.
- MARCZEWSKI, W., HENNING, J., GEBHARDT, C. (2002). The potato virus S resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII. *Theor. Appl. Genet.* 105, 564-567.
- MARCZEWSKI, W., FLIS, B., SYLLER, J., STRZELCZYK-ŻYTA, D., HENNIG, J., GEBHARDT, C. (2001). Two allelic or tightly linked genetic factors at the PLRV.4 locus on potato chromosome XI control resistance to potato leafroll virus accumulation, *Theor Appl Genet* (2004) 109: 1604–1609.
- MASSON, P., SUROSKY, R., KINGSBURY, J.A., FEDOROFF, N.V. (1987). Genetics and molecular analysis of the Spm-dependent *a-m2* alleles of the maize *a* locus. *Genetics* 177, 117-137.
- MCGREGOR, C.E., VAN TREUREN, R., HOEKSTRA, R., VAN HINTUM, TH.J.L. (2002). Analysis of the wild potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLPs: implications for ex situ conservation. *Theor. Appl. Genet.* 104, 146-156.
- MEKSEM, K., LEISTER, D., PELEMAN, J., ZABEAU, M., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. (1995). A high resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 249, 74-81.
- MEYER, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10.391-399.
- MILBOURNE, D., MEYER, R.C., BRADSHAW, J.E., BARID, E., BONAR, N., PROVAN, J., POWELL, W., WAUGH, R. (1997). Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3, 127-136.
- MILBOURNE, D., MEYER, R.C., COLLINS, A.J., RAMSAY, L.D., GEBHARDT, C., WAUGH, R. (1998). Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259, 233-245.
- MITCHELL, S.E., KRESOVICH, S., JESTER, C.A., HERMANDEZ, C.J., SWECZ-MCFADDEN, A. (1997). Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semiautomated allele sizing for genotyping plant genetic resource. *Crop Sci.* 37, 617-624.
- MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T.G., YANO, M., BHATIA, C.R., SASAKI, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol Breed* 3: 87-103.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3, 175-182.

- NIEWOJNER, J., SALAMINI, F., GEBHARDT, C. (1995). Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles Gro1 and H1, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol. Breed.* 1, 57- 78.
- ONDŘEJ, M. (2003). Transgenic Organisms, Genetic Engineering and Biotechnology. *Život. Prostr.*, 37 (2): 20-21.
- ONDŘEJ, M., DROBNÍK, J. (2002). *Transgenoze rostlin*. Academia, Praha.
- ORGANISYAN, A.S., KOCHIEVA, E.Z., RYSKOV, A.P. (1996). Fingerprinting potato species and cultivars by the RAPD-PCR method. *Genetika* 32, 448-451.
- OSUSKY, M., OSUSKA, L., HANCOCK, R.E., KAY, W.W., MISRA, S. (2004). Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research*, 13, 181–190.
- OVESNÁ, J. (2005). Monitoring GMO v zemědělských a potravinářských produktech. In: Stejskal V., Kocourek F., Pažourková Z. (2005): *Sborník ze semináře: Přínosy a rizika GMO využívaných v zemědělství a potravinářství ve vztahu k bezpečnosti potravin a k ochraně životního prostředí*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně.
- OVESNÁ, J., KUČERA, L., CHÁB, D., POUCHOVÁ, V. (2005). Možnosti stanovení geneticky modifikovaných odrůd polních plodin. In: *Sborník separátů ze VII odborného a vědeckého semináře „OSIVO A SADBA“* ČZU Praha.
- PADEGIMAS, L., SHUL'GA, O.A., SKRIABIN, K.G. (1994): Creation of transgenic plants *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*, resistant to the herbicide phosphinothricin. *Molecular Biology*, 28, 437–443.
- PALUCHA, A., ZAGÓRSKI, W., CHRZANOWSKA, M., HULANICKA, D. (1998). An antisense coat protein gene confers immunity to potato leafroll virus in a genetically engineered potato. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:287-293.
- PATERSON, A.H., TANKSLEY, S.D., SORRELLS, M.E. (1991). DNA markers in plant improvement. *Adv. Argon.* 46, 39-90.
- PATTANAYAK, D., CHAKRABARTI, S.K., NAIK, P.S. (2002). Genetic diversity of late blight resistant and susceptible Indian potato cultivars revealed by RAPD markers. *Euphytica* 128, 183-189.
- PEARCE, S.R., HARRISON, G., LI, D., HESLOP-HARRISON, J.S., FLAVELL, A.J., KMAR, A. (1997). Characterisation and genomic organization of the Ty1-copia group retrotransposons in rye (*Secale cereale*). *Genome* 40, 617-625.

- PEARCE, S.R., HARRISON, G., LI, D., HESLOP-HARRISON, J.S., KMAR, A., FLAVELL, A.J. (1996). The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Mol. Gen. Genet.* 250, 305-315.
- PEREIRA A, SCHWARZ-SOMMER Z, GIERL A, BERTRAM I, PETERSON PA, SAEDLER H (1985) Genetic and molecular analysis of the Enhancer (En) transposable elements system of *Zea mays*. *EMBO J.* 4, 17-23.
- PIETERSE, L., HILS, U. (eds) (2007) 2007 World Catalogue of Potato Varieties. (Clenze: Agrimedia GmbH, Germany).
- PLASCHKE, J., GANAL, M.W., RÖDER, M.S. (1995). Detection of genetic diversity in closely related beard wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91, 1001-1007.
- POEHLMAN, J.M., SLEEPER, D.A. (1995). *Breeding Field Crops*. 4th Ed (Indian print) Panima Publishing Corporation, New Dehli, Bangalore.
- PÖPPING, B. (2001). Methods for the detection of genetically modified organisms: Precision, pitfalls and proficiency (<http://americanclinicallaboratory.com/articles/al/a0102pop.pdf>)
- PORCEDDU, A., ALBERTINI, E., BARCACCIA, G., FALCINELLI, M. (2002). Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two-way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor. Appl. Genet.* 104,273-280.
- PROVAN, J., POWELL, W., WAUGH, R. (1996). Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 92, 1078-1084.
- PŘIBYLOVÁ, R., PAVLÍK, I., ROZSYPALOVÁ, Z., BARTOŠ, M. (2006). A PCRbased method for the detection of genetically modified potatoes by the gene ac2 from *Amaranthus caudatus*. *Eur Food Res Technol.* 223: 139 – 142.
- RAFALSKI, J.A. (2002). Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Sci.* 162: 329–333.
- RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1993). Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 8, 275-280.
- RONG, J.K., ABBEY, C., BOWERS, J.E., BRUBAKER, C.L., CHANG, C., CHEE, P.W., DELMONTE, T.A., DING, X.L., GARZA, J.J., MARLER, B.S. (2004). A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission of cotton (*Gossypium*). *Genetics.* 166:389–417.
- RÖDER, M.S., PLASCHKE, J., KONIN, S.U., BORNER, A., SORRELLS, M.E., TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W. (1995). Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246, 327- 333.

- ROUT, G.R., MOHAPATRA, A., JAIN, S.M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol Adv.* 24, 531-560.
- RUSSEL, J.R., FULLER, J.D., MACAULATY, M., HATZ, B.G., JAHOOOR, A., POWELL, W., WAUGH, R. (1997). Direkt comparison pf levels of genetic variation aminy barely accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95: 714-722.
- SCHNEIDER, K., DOUCHES, D.S. (1997). Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *Am. Potato J.* 74, 149-160.
- SELITRENNIKOFF, C. P., WILSON, S. J., CLEMONS, K. V., STEVENS. D. A. (2000). Zeamatin, an antifungal protein. *Curr. Opin. Anti-infective Invest. Drugs* 2:368–374.
- SHIRASU, K., SCHULMAN, A.S., LAHAYE, T., SCHULZE-LEFERT, P. (2000). A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res.* 10, 908-915.
- SLATER, A., SCOTT, N.W., FOWLER, M.R. (eds.) (2003). *Plant Biotechnology, the Genetic Manipulation of Plants*. 1st ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- SOSINSKI, B., DOUCHES, D.S. (1996). Using polymerase Chin reaction based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivar. *Hort. Sci.* 31, 130- 133.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., GUPTA, M. (1996). Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *Hort. Sci.* 31, 729-741.
- SUONIEMI, A., NARVANTO, A., SCHULMAN, A.H. (1996). The BARE-1 retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Mol. Biol.* 31, 295-306.
- SUTTON, W.D., GERLACH, W.L., SCHWARTZ, D., PEACOCK, W.J. (1984). Molecular analysis of Ds controlling element mutations at the Adh1 locus of maize. *Science* 223, 1265-1268.
- TANKSLEY, S.D., ZOUNY, N.D., PATERSON, A.H., BONIERBALE, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio. Technol.* 7, 257-264.
- TRIBSCH, A., SCHÖNSWETTER, P. & STUESSY, T.F. (2002). *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the ice-age in the Eastern Alps. *American Journal of Botany*, 89, 2024–2033.
- VAN DEN BERG, B. (1997). Horizontal ultrathin-layer multizonal electrophoresis of DNA: An efficient tool for large-scale polymerase Chain reaction (PCR) fragment analysis. *Electrophoresis* 18, 2861-2864.
- VAN DEN BERG, R., BRYAN, G., DEL RIO, A., SPOONER, D. (2002). Reduction of species in the wild potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR data. *Theor. Appl. Genet.* 105, 1109-1114.



- VAN DER VOORT, J.K., VAN ECK, H.J., DRAAISTRA, J., VAN ZANDVOORT, P.M. (1998). An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol. Breed.* 4, 73-77.
- VAN DER WILK, F., POSTHUMUS-LUTKE WILLINK, D., HUISMAN, M. J., HUTTINGA, H., GOLDBACH, R.(1991): Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato plants inhibits viral infection. *Plant Mol. Biol.* 17, 431—439.
- VAN ECK, H.J., JACOBS, J.E.M., STAM, P., TON, J., STIEKEMA, W.J., JACOBS, E. (1994). Multiple alleles for tuber shape in dioploid potato detected by quantitative and qualitative genetic analysis using RFLPs. *Genetics* 137, 303-309.
- VAN ECK, H.J., VAN DER VOORT, J.K., DRAAISTRA, J., VAN ZANDRVOORT, P., VAN ENCKEVORT, E., SEGERS, B., PELEMAN, J., JACOBSEN, E., HELDER, J., BAKKER, J. (1995). The inheritance and chromosomal localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breed.* 1, 397-410.
- VAN ECK, H.J., JACOBS, J.E.M., VAN DIJK, J., STIEKEMA, W.J., JACOBSEN, E. (1993). Identification and mapping of three flower colour loci of potato (*S. tuberosum* L.) by RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 86:295-300.
- VAN OS H, ANDRZEJEWSKI, S., BAKKER, E., BARRENA, I., BRYAN, G., CAROMEL, B., GHAREEB, B., ISIDORE, E., JONG, W., KOERT, P., LEFEBVRE, V., MILBOURNE, D., RITTER, E., VOORT, R., ROUSSELLE-BOURGEOIS, F., VLIET, J., WAUGH, R., VISSER, R., BAKKER, J., ECK, H. (2006). Construction of a 10,000 marker ultra-dense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genome-wide physical map. *Genetics* 173, 1075-1087.
- VAN TREUREN, R., MAGDA, A., HOEKSTRA, R., VAN HINTUM, TH.J.L. (2004). Genetic and economic aspects of marker-assisted reduction of redundancy from a wild potato germplasm collection. *Genet. Res. Crop Ev.* 51, 277-290.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H. (2001). Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Res.* 11, 2041-2049.
- VIRK, P.S., ZHU, J., NEWBURY, H.J., BRYAN, G.J., JACKSON, M.T., FORD-LLOYD, B.V. (2000). Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275-284.
- VITTE, C., LAMY, F., ISHII, T., BRAR, D.S., PANAUD, O. (2004). Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa*, L.). *Mol. Gen. Genom* 272, 504-511.

- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HOMES, M., FREIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZEBEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- VOYTAS, D.F., CUMMINGS, M.P., KONIECZNY, A., AUSUBEL, F.M., RODEEMAL, S.R. (1992). Copia-like retrotransposon are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7124-7128.
- WALBOT, V. (1992). Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43, 49-82.
- WANG, Z., WEBER, J.L., ZHANG, G., TANKSLEY, S.D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88, 1-6.
- WAUGH, R., BONAR, N., BAIER, E., THOMAS, B., GRANER, A., HAYES, P., POWELL, W. (1997). Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* 255, 311-321.
- WEISING, K., NYVÉM, H., WOLFF, K., MAYER, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plant and Fungi.* (Boca Raton: CRC press).
- WEISING, K., WINTER, P., HUTTEL, B., KAHL, G. (1998). Microsatellite markers for molecular breeding. *J. Crop Prod.* 1, 113-143.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- WILLIAMS, C.E., WIELGUS, S.M., HABERLACH, G.T., GUENTHER, C., KIM-LEE, H., HEGELSON, J.P. (1993). RFLP analysis of chromosomal segregation in progeny from an interspecific hexaploid somatic hybrid between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Genetics* 135, 167-1173.
- XIONG, Y., EICKBUSCH, T.H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequence. *EMBO J.* 9, 3353-3362.
- YENCHO, G.C., BONIERBALE, M.W., LINGEY, W.M., PLAISTED, R.L., TANKSLEY, S.D. (1996). Molecular markers locate genes for resistance to Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in hybrid *Solanum tuberosum* x *S. berthaultii* potato progenies. *Entomol. Exp. Ann.* 81, 141-154.
- ZDEŇKOVÁ K., JANOTOVÁ P., DEMNEROVÁ K. (2004). Detekce geneticky modifikovaných organismů v potravinách a potravinářských surovinách. In: Káš J. (2004): Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy. Vysoká škola chemickotechnologická ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí, Praha.

- ZIETKIEWICS, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.
- ŽEL J., CANKAR K., RAVNIKAR M., CAMLOH M., GRUDEN K. (2005). Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection. *Accred Qual Assur.* 10: 531-536.
- ŽIŽKA J. (2007). Situační a výhledová zpráva. Brambory. MZe ČR, Praha.
- ŽUKOVSKIJ, P.M. (1971). Kulturnyje rastenija i ich sorodiči. Leningrad, Kolos. In: Chloupek O. (2000). Genetická diversita, šlechtění a semenářství. Academia. Praha.

## 5. CONCLUSION

The submitted study has showed the application of different molecular, or more precisely DNA, markers to investigate questions from the area of molecular markers utilization in potato characterisation, namely for variety identification and GMO testing.

It has been evolved and optimized methodology of RAPD, SSR, ISSR, AFLP, IRAP, GMO detection and quantification analyses including the optimization of DNA isolation for specific usage.

From the chosen molecular markers and techniques SSR and IRAP are the most powerful tools for the potato variety identification. Therewithal, the question of RAPD marker was solved before my onset and these and my own results confirm the instability of this marker cited in literature. Likewise, the same problem was discovered in ISSR marker that afford higher number of amplified bands than SSR marker, but also there were detected intra-variety differences and instability dependent on DNA age and origin. AFLP method is an interesting but on the other hand expensive and time consuming and its application will be solve in Biotechnological Centre in early future.

The proposed methods for GMO detection and quantification allow specific detection of transgene presence in tubers, leaves and potato germ. Both methods, multiplex PCR and Real-Time PCR, are suitable tools for solution GMO testing task. Evaluation of these methods are based on calibration curve and the usage for given task is dependent on detection and quantification limits. For the duplex PCR the detection limit was 10 per cent contamination of the transgene (2.5 ng DNA transgenic organism) and it is obvious that this method is suitable especially for GMO detection and prime screening. Otherwise, for the Real-Time PCR method was detection limit 0.01 per cent and quantification limit 0.05 per cent along with the higher financial and technical demand the effective tools for GMO quantification.

Conclusion summary:

1. It was proof that the molecular markers based on DNA analysis are a suitable tool for the identification of potato varieties. From the tested methods RAPD, SSR, ISSR, AFLP and molecular markers based on retrotransposon analyses proved to be for the given problem of potato variety identification more utilisable molecular markers method SSR and IRAP (data for the pilot file are summarized in papers 2 and 3). Data based on SSR analyses for 164 varieties registered in Czech Republic

are available on <http://www.katalogbrambor.cz> that is also the output of submitted study together with the adopted methodology 1.

2. Likewise, it was approve that the DNA analyses based on PCR is suitable tool for GMO detection and quantification. Accurately, the multiplex PCR analyse is a cheap, fast and reliable approach for GMO detection; on the other hand detection and quantification limits are not sufficient for the GMO quantification. In contrast, Real-Time PCR method is expensive and it is need to have specific equipment for detection of the emitted signal, but the detection and quantification limits are sufficient. The output of this part is the methodology 2.

## 6. OVERVIEW OF THE OBTAINED RESULTS

### Scientific journals with IF

*Nováková A., Čurn V. Molecular markers in potato breeding and variety identification, Potato Research (submitted to edition).*

This review article is focused on the recapitulation of the current knowledge on the field of usage of molecular markers in potato and it served as the analysis of present issues in this area.

### Reviewed Scientific journals

*Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. Utilization of molecular markers based on microsatellites polymorphism for potato variety identification cultivated in CR, JCEA (submitted to edition)*

This paper summarised the pilot study of molecular markers based on microsatellites polymorphism usage for potato variety identification. In this study we analyzed twenty potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) cultivated in the Czech Republic. Every variety was represented by four independent replicates. This set of samples was analyzed by methods of PCR-SSR (Simple Sequence Repeats) and PCR-ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). We obtained pattern of six SSR and five ISSR markers for the set of twenty selected varieties registered and cultivated in the Czech Republic in the year 2007. Recorded polymorphism was appraised and the varieties were separated to the categories by the fingerprint data. We discovered that both of tested methods afford sufficient polymorphism for variety identification. The method of SSR analysis is suitable for evaluation of variability and for the purposes of variety identification. On the other hand ISSR method conveys plentiful polymorphism but the disadvantage is a polymorphism within variety and we observed also the instability of the pattern depending on the age of DNA, likewise RAPD analyses.

*Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses, Czech J. Genet. Plant Breed., 45, 2009 (1): 1–10*

This article epitomizes the pilot study aimed at the usage of molecular markers based on retrotransposon analyses for potato variety identification. We analyzed a set of twenty potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties presented in the Czech Variety List using the PCR-IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) method in order to distinguish fast

and unambiguously the varieties. The recorded pattern of markers was stable and reproducible. The analyses were repeated three times and identical results were always obtained. The best resolution of individual varieties was obtained if all three primers were evaluated as a complex. The use of retrotransposon based markers appears to be suitable for the differentiation of large sets of potato samples and should be an eligible complement to other molecular markers used in potato variety identification such as Simple Sequence Repeats (SSR) and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP).

## **Methodology**

***Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (Solanum tuberosum L.) / Methodology of DNA isolation and molecular markers analysis for description of genetic resources and identification of potato varieties (Solanum tuberosum L.), V. Čurn, A. Nováková, K. Šimáčková, B. Kubátová, ISBN: 978-80-7394-135-2.***

This methodology is targeted on the use of molecular markers based on DNA analysis for the purpose of potato variety description and identification, for the purposes of verification of variety identity and purity of seed. The procedures can be used for description and characterization of breeding material and gene resource used in the breeding process. The work summarised whole process including the assessment of individual procedures from DNA extraction over the description of suitable molecular markers and their characterisation and possibility of visualization to the description of appropriate statistical methods. There are used knowledge obtained from the pilot studies and older data.

***Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (Solanum tuberosum L.) / Methodology of DNA isolation and GMOs detection in potato (Solanum tuberosum L.), V. Čurn, A. Nováková, K. Šimáčková (submitted)***

The methodology is concerned to the GMO detection and quantification in potato. The work includes procedures for the isolation of DNA from leaves and tubers, and methods for detection and quantification of the transgene in potato based on DNA analyses with the PCR usage. Development and optimization of procedures for the detection of the transgene will allow the monitoring of GM potatoes at all levels of the cultivation, storage and handling of plant material. There is summarised the comprehensive process from the DNA extraction over the analytical method according the targeted use detection/quantification to the statistical methods.

## 7. PAPERS

1. Molecular markers in potato breeding and variety identification
2. Utilization of molecular markers based on microsatellites polymorphism for potato variety identification cultivated in CR
3. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses
4. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) / Methodology of DNA isolation and molecular markers analysis for description of genetic resources and identification of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.)
5. Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.) / Methodology of DNA isolation and GMOs detection in potato (*Solanum tuberosum* L.)



## **7.1. Molecular markers in potato breeding and variety identification**

**Nováková A., Čurn V.**

Editorial Manager(tm) for Potato Research  
Manuscript Draft

Manuscript Number: POTR88R1

Title: MOLECULAR MARKERS IN POTATO VARIETY IDENTIFICATION

Article Type: Review Paper

Keywords: AFLP, microsatellite, RAPD, retrotransposon, RFLP, potato, variety identification

Corresponding Author: ALENA NOVAKOVA,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Alena Novakova

Order of Authors: Alena Novakova; Vladislav Čurn

**Abstract:** Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important crops worldwide. The identification of individual varieties is important at every stage of their agri-production, during their breeding, registration, seed-production, and testing processes. The traditional approach to variety identification is carried out by observing and recording a range of morphological characters or descriptors. Furthermore, morphological characters are often multigenic, not available at all growth stages and influenced by environmental interactions, making it difficult to assess them quickly and objectively, and requiring repeated observations.

New molecular and biochemical marker techniques evolved with advances in molecular biology. These techniques have become a powerful tool for determining genetic distinctness and enable the characterization of particular genotypes. The use of molecular markers for variety identification of agricultural crops was widely applied in the last decade on the basis of exactly determining genetic variation based on DNA analysis. This is important, because detection of the requested traits is not influenced by environmental factors.

Plant and potato breeders, as well as state control and inspection authorities, need reliable tools for variety identification. In addition, a large number of samples must be analyzed. The large

number of registered potato varieties increases the complexity of this process. Several methods have been recommended for potato variety identification, to which should be included RFLP, RAPD, AFLP, SSR-PCR, ISSR-PCR, SNP and retrotransposon based techniques.

Response to Reviewers: Dear Dr. Lommen,

I send you revised manuscript with modifications according to reviewers' comments. The title and text of manuscript was changed and focused to potato variety identification and all other comments of reviewer 1 were accepted.

Comments to reviewer 2:

- manuscript was revised by Dr. Keith Edwards and prof. Steven Travis, biologists from USGS
- we have collaboration with some potato breeding institutes and we assume that molecular approach is now really widely used in breeding programs, to mark specific traits, and in genotype/variety description and identification
- new papers from 2007-2008 was added and chapter about SSRs was rewritten
- paragraph 3 on page 3 was excluded
- we do not state that molecular techniques replace "standard" methods of DUS testing, these techniques are some additional marker system, but very often used e.g. for inspection of variety declaration in trade (confirmation of variety purity from tuber material), so we agree with reviewer
- chapters – SSR and SNP were rewritten and appended
- new information about potato genetic map including suggested publications were added
- comments to AFLP – we discussed it with colleagues from NWRC (USGS) and Wageningen university, they used AFLP also for these purposes but finally we decided to exclude this controversial information
- we have already information about TIGR database in our text, but in different paragraph
- we added suggested papers (and some new ones) to SSR chapter

1 MOLECULAR MARKERS IN POTATO VARIETY IDENTIFICATION

2

3 Alena Nováková and Vladislav Čum

4

5 *Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Studenstská*

6 *13, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic*

7 *e-mail: alena.n@seznam.cz*

8

1 **Abstract**

2 Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important crops  
3 worldwide. The identification of individual varieties is important at every stage of their agri-  
4 production, during their breeding, registration, seed-production, and testing processes. The  
5 traditional approach to variety identification is carried out by observing and recording a range  
6 of morphological characters or descriptors. Furthermore, morphological characters are often  
7 multigenic, not available at all growth stages and influenced by environmental interactions,  
8 making it difficult to assess them quickly and objectively, and requiring repeated  
9 observations.

10 New molecular and biochemical marker techniques evolved with advances in  
11 molecular biology. These techniques have become a powerful tool for determining genetic  
12 distinctness and enable the characterization of particular genotypes. The use of molecular  
13 markers for variety identification of agricultural crops was widely applied in the last decade  
14 on the basis of exactly determining genetic variation based on DNA analysis. This is  
15 important, because detection of the requested traits is not influenced by environmental factors.

16 Plant and potato breeders, as well as state control and inspection authorities, need  
17 reliable tools for variety identification. In addition, a large number of samples must be  
18 analyzed. The large number of registered potato varieties increases the complexity of this  
19 process. Several methods have been recommended for potato variety identification, to which  
20 should be included RFLP, RAPD, AFLP, SSR-PCR, ISSR-PCR, SNP and retrotransposon  
21 based techniques.

22  
23 **Key words**

24 AFLP, microsatellite, RAPD, retrotransposon, RFLP, potato, variety identification  
25

1 INTRODUCTION

2  
3 Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is, along with wheat, rice and maize, one of  
4 the four most valuable world crops. Potato is an important food crop, as well as being widely  
5 used for livestock feeding and industrial processing as feedstock for many industrial and food  
6 applications. Currently, there are more than 4,200 different potato varieties that are cultivated  
7 in over 100 countries worldwide (Hamester and Hils 2003, Hils and Pieterse 2007).

8 The improvement and creation of new varieties with new combinations of current  
9 features or essentially new features, such as GMO potatoes or conventional varieties with  
10 better parameters of quality or resistance to biotic and abiotic factors, is one of the main goals  
11 of plant breeding. In many cases, wild allied species or "old primitive" varieties are used as  
12 donors of these features. New breeding approaches based on molecular markers allows for a  
13 more efficient use of these donors (Callow et al. 1997). The success of a breeding program is  
14 dependent on new knowledge and study of the genetic diversity of germplasm. The breeder's  
15 advantage is the ability to detect the requested characters already in the first-stage of  
16 development of a growing plant and the early-generation of the breeding process. Also the  
17 identification of individual varieties of agricultural and horticultural crops is important at  
18 every stage of their agri-production: during their breeding, registration process, seed-  
19 production, and testing (Görg et al. 1992). Our ability to discriminate between and identify  
20 varieties of agricultural and horticultural crops is thus fundamental to the operation of the  
21 modern seed trade. All sectors of the industry, from breeders through the registration  
22 authorities, seed producers, seed certification and testing agencies, seeds merchants, farmers,  
23 growers, grain merchants, processors and other end users, benefit from variety verification at  
24 some stage in their activities.

25 The traditional approach to variety identification is composed of the observation and  
26 recording of a range of morphological characters or descriptors. While in practice this is  
27 largely successful and forms the basis, for instance, of most current testing procedures for  
28 Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) and the granting of Plant Breeders Rights  
29 (PBR), it can be an expensive and time-consuming process. The number of useful descriptors  
30 is limited in some species. Guidelines for potatoes, for instance, consist of 50 characters, 12  
31 of which are concerned with sprouting, along with a series of characters such as plant height,  
32 leaf size and various features of the flowers and tubers. Such an approach is undoubtedly  
33 successful for DUS testing. However, it is less suitable when results are required rapidly, such  
34 as for the confirmation of tuber material identification. Furthermore, morphological characters  
35 are often multigenic, not available at all growth stages and influenced by environmental  
36 interactions, making it difficult to assess them quickly and objectively, and requiring  
37 replication of observation.

38 Together with advances in molecular biology, several new molecular and biochemical  
39 marker techniques will be adopted. These techniques are a powerful tool for determining  
40 genetic distinctness and enable characterization of particular genotypes. The first groups of  
41 these approaches are techniques based on protein polymorphism. But these techniques have  
42 several disadvantages; in addition to the basic disadvantages of storage protein and isozyme  
43 analysis, they are available to mark only a limited number of genes (and potential traits), their  
44 genome coverage is low, and they are strongly influenced by plant ontogenetic stage and  
45 environmental conditions (Desborough and Peloquin 1968).

46 Use of molecular markers for variety improvement of agricultural crops and  
47 identification of desirable genotypes has been widely applied in the last decade to exactly  
48 determine genetic variation based on DNA analysis (Staub et al. 1996). This is an important  
49 development, because detection of requested traits is not influenced by environmental factors.  
50 Molecular markers also allow genotypic selection instead of traditional phenotypic selection.

1 This approach is mostly used in the newly developed breeding system called molecular  
2 marker-assisted selection (MMAS) (Paterson et al. 1991). MMAS is an example of the highly  
3 effective utilization of plant biotechnology in crop breeding. One of the first and very  
4 important applications of MMAS, gene introgression from a donor genotype to a recurrent  
5 one using backcrossing, was described by Tanksley et al. (1989).

6 Plant and potato breeders, as well as state control and inspection authorities, need  
7 reliable tools for variety identification. Further demands are their routine application to large  
8 number of analyzed samples. All of these requirements are complicated enough for the  
9 enormous number of registered potato varieties; there are listed almost 1200 varieties in the  
10 EU catalogue of registered varieties (European Commission 2007), and this number is always  
11 increasing with new varieties being registered. Several marker classes such as RAPD, AFLP,  
12 SNP, SSR-PCR and ISSR-PCR are recommended for potato variety identification.

#### 13 MOLECULAR MARKERS TECHNIQUES 14 15

16 Molecular markers in potato breeding are used for variety identification (Gebhardt et  
17 al. 1989a), phylogenetic studies (Kardolus et al. 1997), analysis of recombination frequencies  
18 between genotypes (Williams et al. 1993), identification of genes for important agricultural  
19 traits (Gebhardt 1994) and marker assisted selection (Hamalainen et al. 1997).

20 The main goals of any breeding program are transfers of valuable traits between  
21 distinct genotypes and selection of new combinations and recombinations. Molecular markers  
22 play an important role as tools for achieving these goals. The first step of this process is the  
23 identification of one or several candidate genes linked to a particular agronomical trait and  
24 also incorporation of these markers into the potato molecular map (Barone 2004). The potato  
25 molecular map was at the turn of lillennium one of the most saturated genetic maps, which  
26 allows for its extensive exploitation in the MMAS approach to potato breeding. The original  
27 map was constructed on the basis of segregation of RFLP markers (Boniebale et al. 1998;  
28 Gebhardt et al. 1989b). The potato map was considered to be well saturated, containing more  
29 than 350 mapped markers almost evenly distributed across 12 potato chromosomes and  
30 covers approximately 90% of the potato genome (Gebhardt et al. 1991). The map was further  
31 innovated and the potato database containing molecular maps of all twelve potato  
32 chromosomes with about 1000 mapped elements, sequence data, putative gene functions,  
33 results from BLAST analysis, SNP and InDel information from different diploid and  
34 tetraploid potato genotypes, publication references, links to other public databases was  
35 developed (Meyer et al. 2005). At present UHD potato map contains more than 10000  
36 markers and represent powerful tool in genomics and molecular marker approach in potato  
37 breeding (Van Os et al. 2006). This high number of markers and genome coverage allows for  
38 physical gene location: finding genes for particular agronomic traits. More than 25 genes with  
39 single dominance have been inserted into this map, with some of them identified as resistance  
40 genes and linked to QTL's-markers yield and potato quality (Barone 2004). The existence of  
41 such a molecular map also allows for carrying out positive selection in the breeding process.  
42 Known important agronomic genes include genes controlling flower color (Van Eck et al.  
43 1994) or tuber color (Gebhardt et al. 1991), color of tuber pulp (Boniebale et al. 1998), tuber  
44 shape (Van Eck et al. 1994), leptine content (Hutvagner et al. 2001), and resistance genes  
45 (Boniebale et al. 1994; Niewohner et al. 1995; Yenko et al. 1996; Hamalainen et al. 1997;  
46 Gebhardt and Valkonen 2001; Kuhl et al. 2001; Marczewski et al. 2002). DNA markers are  
47 suitable for the detection of genetic diversity (Plaschke et al. 1995; Kim and Ward 1997;  
48 Davila et al. 1998). The most important techniques and widely used markers have been RFLP,  
49 RAPD, SNP, AFLP and SSR. The last two techniques are now the most used.

50

1 RFLP

2 RFLP (restriction fragment length polymorphism) is based on the variations in the  
3 length of DNA fragments produced by a specific restriction endonuclease from genomic  
4 DNAs of two or more individuals of a species (Kahl 2001). Probe-based methods like RFLP  
5 were the first widely reported means of revealing DNA sequence variations in a diverse range  
6 of organisms, including varieties (Ainsworth and Sharp 1989; Weising et al. 1995; Karp et al.  
7 1996). RFLP analysis uses genomic or cDNA clones as probes following restriction of the  
8 target DNA with a specific enzyme. This is a very effective way of revealing differences  
9 between varieties and the large number of restriction enzyme/probe combinations available  
10 makes RFLP analysis a powerful tool, which is also robust, producing repeatable results in  
11 different laboratories. RFLPs are relatively small in size and are co-dominant in nature. For  
12 identification, the use of multiple copy probes, either of random or known derivation, can be  
13 advantageous (Lee et al. 1996). Görg et al. (1992) were able to identify 122 out of 134 potato  
14 varieties using *Taq-I* restricted DNA and a multi-locus probe known as GP-35. Cooke (1995)  
15 used repetitive oligonucleotides as probes, with the (GATA)<sub>n</sub> repeats proving to be widely  
16 applicable. Görg et al. (1992) used the RFLP method to identify 136 tetraploid potato  
17 varieties. This method unambiguously discriminated 130 potato varieties. However, there are  
18 some difficulties associated with this approach, including the need for relatively large  
19 amounts of good quality DNA, the source and public availability of certain probes, the  
20 relatively high cost of analyses, the length of time taken for results to be produced and the fact  
21 that radioactive labelling of probes is widely used to reveal the DNA profiles, which together  
22 undoubtedly place a limitation on its more routine use (Mandolino et al. 1996).

23  
24 PCR and PCR based techniques

25 Amplification techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) address some  
26 of these difficulties and offer apparent advantages over RFLP. PCR is a method that allows  
27 the production of millions of copies of particular pieces of DNA, thus facilitating their  
28 analysis (Weising et al. 1995). Arbitrary chosen primers have been shown to act as templates  
29 for the amplification of several fragments of genomic DNA, which led to the development of  
30 the RAPD (random amplified polymorphic DNA) and AP-PCR (arbitrarily primed – PCR)  
31 techniques (Welsh and McClelland 1990). There has been a huge interest in these methods for  
32 variety discrimination and identification, with reports of their use in well over 75 different  
33 plant species, including all of the widely grown cereal, oilseed and root crops, and also fruit,  
34 vegetables and ornamental species (Rout et al. 2006; Barcaccia et al. 2003; Rafalski 2002).

35  
36 RAPD

37 RAPD analyses result in faster identification, because they need relatively little target  
38 DNA, avoid the use of radioactivity, require no prior knowledge of the DNA sequence of  
39 interest and use readily commercially available materials. Thus, RAPDs detect  
40 polymorphisms distributed throughout the genome with a primer amplifying several bands,  
41 each probably originating from a different locus. Concern has arisen more recently, however,  
42 about the reproducibility of RAPD profiles, especially between laboratories. Chakrabarti et al.  
43 (2006) found that the RAPD profiles obtained from different types of tissue might differ even  
44 in the same potato variety. They observed the influence of random primers on the uniformity  
45 of RAPD fingerprints developed from different tissues of a particular variety. This problem is  
46 more serious in case of glasshouse or field grown samples. While this need not necessarily be  
47 an insurmountable problem in the verification context, it would cause major difficulties for  
48 the production of databases and international comparisons. Thus, it seems unlikely that RAPD  
49 will be the profiling method of choice for most applications in seed and variety testing work.  
50 In the last decade, RAPD markers have been used for the characterization of potato varieties



1 in North America (Sosinski and Douches, 1996) Russia (Organisyan et al. 1996), Japan  
2 (Hosaka et al. 1994), Australia (Ford and Taylor 1997), Canada (Demeke et al. 1993) and  
3 India (Chakrabarti et al. 1998, 2001; Pattanayak et al. 2002).

#### 4 AFLP

5  
6 The amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique combines principles  
7 of RFLP analysis with PCR technology (Vos et al. 1995). Total genomic DNA is digested  
8 with two restriction enzymes. Adaptors of known sequence are then ligated to the DNA  
9 fragments. Primers complementary to the adaptors, with additional 1-3 selective nucleotides  
10 on the 3'-end, are used to amplify the restriction fragments. The PCR-amplified fragments  
11 can then be separated by gel electrophoresis and the banding patterns visualized. A range of  
12 enzymes and primers are available to manipulate the complexity of AFLP fingerprints to suit  
13 the application. Care is needed in the selection of primers with selective bases. AFLP profiles  
14 require no prior DNA sequence information and the number and nature of fragments  
15 amplified are altered by the choice of primer pair. The technique also has the advantage of  
16 sampling many loci simultaneously and, in addition, is more robust than arbitrary priming  
17 techniques such as RAPD, since more stringent conditions are used in the PCR. AFLP has  
18 predominantly been applied in genetic mapping studies (Ballvora et al. 1995; Becker et al.  
19 1995; Meksem et al. 1995; Van Eck et al. 1995).

20 AFLP has been used to analyze varieties of various species, including cereals,  
21 potatoes, sunflowers, Brassicas, beans and lentils (Cooke and Reeves 1998; Law et al. 1998).  
22 AFLP analysis represents a very flexible approach, which has been used in potatoes  
23 (Milbourne et al. 1997). Many loci are sampled simultaneously, making AFLP profiles  
24 complex, which can make interpretation complicated. Again, most AFLP analyses currently  
25 use radioactively labelled primers, which is both costly and inconvenient. There are, however,  
26 some considerable advantages, in that many samples can be analyzed simultaneously, no  
27 knowledge of the DNA sequences is required and the flexibility of the approach makes it very  
28 powerful. The method is perhaps especially useful when large numbers of samples have to be  
29 compared. Kardolus et al. (1997) obtained highly informative DNA fingerprints using AFLP.  
30 Those analyses were generated using 19 taxa of *Solanum* sect. *Petota* (potatoes) and three taxa  
31 of *Solanum* sect. *lycopersicum* (tomatoes). AFLP fingerprints generated 12 to 71 scorable  
32 fragments per genotype, which was sufficient for taxonomical interpretation. Van Treuren  
33 et al. (2004) used AFLP analyses for collection management or, more precisely, for reduction of  
34 redundancy from a wild potato germplasm collection. In the set of 499 plants, 137 fragments  
35 were scored and 82 of these fragments were polymorphic and 97 different AFLP genotypes  
36 were observed among the 499 individuals investigated. No variation was observed within two  
37 potential duplication groups, whereas only limited differentiation among accessions was  
38 detected within seven groups, resulting in a total of 15 redundant accessions.  
39 McGregor et al. (2002) used AFLP to analyze the wild potato germplasm of the series  
40 *Acaulia*. They analyzed 625 plants and scored 130 polymorphic bands. They re-classified  
41 some samples on the basis of AFLP analyses. Van den Berg et al. (2002) used this method for  
42 analyses of the wild potato germplasm of the section *Petota* series *Longipedicellata*. They  
43 analyzed a set of three species, *S. polytrichon*, *S. hjertingii* and *S. stoloniferum*.

44 Catalogue of AFLP markers was recently created as result of intensive studies and  
45 AFLP based approach in potato genomics. The catalogue is comprised of AFLP fingerprint  
46 images of 733 chromosome specific AFLP markers which are mapped relative to 220 RFLP  
47 loci, isozyme loci, morphological characteristics and disease resistant traits. Images of AFLP  
48 fingerprints combined with detailed information on the genomic location of all AFLP markers  
49 are available at <http://www.spg.wau.nl/pv/aflp/catalog.htm> (Van der Voort et al. 1998).

50

1 SSR

2 Highly repetitive satellite DNA sequences are main components of heterochromatin in  
3 higher eukaryotic genomes. Microsatellites are considered as any one of a series of very short,  
4 middle repetitive, tandemly arranged, highly variable (hypervariable) DNA sequences  
5 dispersed throughout fungal, plant, animal and human genomes (Kahl 2001). The PCR-based  
6 analysis of simple sequence repeats may also prove to be very useful for variety identification  
7 and verification work.

8 Microsatellites are tandemly repeated DNA sequences, usually with a repeat unit of 2-  
9 4 base pairs (Morgante and Olivieri 1993). The di-, tri- or tetranucleotide repeats are arranged  
10 in tandem arrays consisting of 5 – 50 copies. SSRs are abundant in plants, occurring on  
11 average every 6 – 7 kb (Cardle et al. 2000). SSR alleles, amplified products of variable length,  
12 can be separated by gel electrophoresis and visualized by silver-staining, autoradiography (if  
13 primers are radioactively labelled) or via automation (if primers are fluorescently labelled).  
14 SSR analysis is amenable to automation and multiplexing, and allows genotyping to be  
15 performed on large numbers of lines, and multiple loci to be analyzed simultaneously (Cooke  
16 and Reeves 1998). In many species, multiple alleles have been shown to exist for some  
17 microsatellites, due to variations in the copy number of this repeat unit. In order to develop  
18 sequence-tagged site microsatellites, information about the sequence of the DNA flanking the  
19 microsatellite is needed. This information can sometimes be acquired from existing DNA  
20 sequence databases, but otherwise has to be obtained empirically. The frequency of SSR loci  
21 between mammals and plants are five times more frequent in the former (Lagercrantz et al.  
22 1993). Within plants, the frequency is approximately one every 21.2 kb in dicots and every  
23 64.6 kb in monocots (Wang et al. 1994). In potato, Ashkenazi et al. (2001) estimated that one  
24 SSR could be found every 52 kb upon screening for five different motifs. This relatively low  
25 frequency of SSRs constituted one of the major drawbacks in early SSR development, as the  
26 number of microsatellites found by sequencing libraries made the cost per marker very  
27 expensive (Rafalski and Tingey 1993). The first SSRs were developed by screening large  
28 numbers of clones from genomic libraries with repetitive probes (Akkaya et al. 1992; Röder  
29 et al. 1995; Bryan et al. 1997). To overcome this constraint, processes were designed to enrich  
30 libraries for microsatellite motives prior to screening, such as by hybridization to repetitive  
31 oligos bound to magnetic beads (Kijas et al. 1994) or membranes (Edwards et al. 1996),  
32 triplex affinity capture (Milbourne et al. 1998), or selective pre-amplification using oligos  
33 with repeat motives (Bryan et al. 1997). A more practical, economical, and straightforward  
34 approach for species with reasonable DNA sequence database representation is a database  
35 search for SSR sequences, for example <http://www.potgenebank.org/>, <http://www.tigr.org/>,  
36 GenBank or EMBL.

37 The potential of STMS analysis (sequence-tagged microsatellite site – STMS, Hüttel  
38 et al. 1999) for plant breeding and variety-related work in general has generated much  
39 research activity and, as a result, there are now microsatellites available for several crop  
40 species, including wheat, barley, maize, oilseed rape and other Brassicas, sunflowers,  
41 soybean, sugar beet, sweet potato, grapes, tomatoes, yams, citrus fruits and some ornamentals  
42 (Karp et al. 1997; Weising et al. 1998; Cooke and Reeves 1998). Methods have been  
43 published for high throughput, non-radioactive detection of microsatellite alleles (Van den  
44 Berg 1997; Lagoda et al. 1998). The data from STMS analyses are generally easy to score. A  
45 further significant advantage is that microsatellites can be multiplexed, so that a number of  
46 markers (loci) can be evaluated in a single PCR and separated on the same gel. This is not  
47 only more efficient, but is also suitable for automation, which both enhances the data  
48 gathering process and improves cost-effectiveness. Methods of STMS analyses, based on the  
49 differential fluorescent labelling of microsatellite primers and separation of multiplexed  
50 products using automated DNA sequences, are being increasingly used for crop plant

1 genotyping (Mitchell et al. 1997). The use of multiple array capillary electrophoresis for the  
2 rapid (<60 minutes) separation of multiplexed microsatellite products has also been  
3 demonstrated (Mansfield et al. 1998). Such approaches, although requiring expensive capital  
4 investment, have considerable potential for very efficient and automated profiling, database  
5 production and variety verification, and their wider use will prove difficult to resist.

6 DNA-based fingerprinting using SSRs has been well established to effectively  
7 discriminate between tetraploid potato clones (Kawchuk et al. 1996; Provan et al. 1996;  
8 Schneider and Douches 1997; Ghislain et al. 2000; McGregor et al. 2000; Ashkenazi et al.  
9 2001). SSRs can provide a reliable, efficient, and applied DNA-based fingerprinting system  
10 for potato. In potatoes, STMS have been used in North American and European varieties  
11 (Provan et al. 1996; Kawchuk et al. 1996; Schneider and Douches 1997). Also the reliable  
12 maintenance of large culture collections is becoming more problematic due to increasing  
13 number of registered varieties. Microsatellites are relatively rapid method with sufficient  
14 differential ability and this approach is developed as additional marker/description system for  
15 variety identification (Moisan-Thiery et al. 2005; Ispizua et al. 2007; Monica et al. 2007; Reid  
16 and Kerr 2007). Recently SSRs are used as a tool in plant breeding and microsatellite marker  
17 STM5136 was closely linked to the identified QTL for content of alpha-solanine and alpha-  
18 chaconine (total glycoalkaloid, TGA). This application can demonstrate potential of marker-  
19 assisted selection (MAS) approach in modern plant breeding (Sorensen et al. 2008). The  
20 primer pairs have been derived from the EMBL database and include some from tomatoes. In  
21 many cases, a primer pair amplifies a single microsatellite locus, making the data easy to  
22 interpret. Other primer pairs amplify multiple loci and can be useful for identification and  
23 classification. Multiple alleles also exist for some loci, which again is useful for identification  
24 (Cooke 1999). Coombs et al. (2004) applied the DNA amplification pattern of 18 SSR primer  
25 combinations for identification of 17 varieties. Polymorphism was observed with 14 of the  
26 SSRs using agarose gel electrophoresis and PAGE with all 18 SSRs; PAGE resolved between  
27 2 – 12 DNA fragments, while agarose gel electrophoresis resolved between 2 – 7 fragments.  
28 No single SSR primer pair discriminated the panel of the 17 varieties using PAGE or agarose  
29 gel electrophoresis. All 17 varieties were discriminated on PAGE with various combinations  
30 of two primer pairs. Ghislain et al. (2000) used 18 microsatellites from 70 tested, for  
31 germplasm fingerprinting. The reference microsatellites were also used to suggest possible  
32 misclassifications in the germplasm collection as a PGI (potato genetic identification) kit for  
33 routinely tools for true-to-type reference for each new entry samples. Ghislain et al. (2004)  
34 used 156 SSR primers for testing SSR conservation among *Solanum tuberosum* variety  
35 groups. 130 SSR primers generated amplification products in a large set of cultivated potato  
36 accessions comprised of at least four genotypes from each of the eight variety groups of *S.*  
37 *tuberosum*. Of the 156 SSRs tested, 22 were found to be most useful for germplasm  
38 fingerprinting. A group of 18 can be recommended as the most informative for genotyping  
39 cultivated potatoes, based on quality criteria, genome coverage, and locus-specific  
40 information content.

41 The SSR technique was also modified using different primer design; ISSR  
42 markers/technique is such a modification of microsatellite analysis (Zietkiewics et al. 1994;  
43 Kantety et al. 1995). The pattern of ISSR markers is a consequence of PCR amplification of  
44 internal SSR using anchored primers without exact knowledge of their sequence. Hantula et  
45 al. (1996), Charters et al. (1996), and Zietkiewics et al. (1994) found this method to be more  
46 reliable and repeatable than RAPD analysis and ISSR technique provides higher  
47 polymorphism. This technique is more rapid and less time-, labour- and financially-  
48 consuming than AFLP or SSR. The character of ISSR markers is dominant, although some  
49 authors reported the presence of codominant markers (Fischer et al. 1996).

50

1 SNP

2 This polymorphic marker system is based on polymorphism between genotypes  
3 caused by single nucleotide exchange, small deletion or insertion (Kahl 2001). Single  
4 nucleotide polymorphism (SNP) is a marker technology originally developed in human but  
5 studied also in model organisms such as *Drosophila melanogaster* (Long et al. 1998) and  
6 *Arabidopsis thaliana* (Cho et al. 1999). This technology or markers are important genetic tool  
7 for identity testing, genotype-phenotype association studies, and evolution reconstruction  
8 (Wang et al. 1998). SNPs are the most abundant polymorphic marker with 2 – 3 polymorphic  
9 sites every kilo base (Cooper et al. 1985) or they occurred at a frequency of about one SNP in  
10 1000 nucleotides in genomic DNA (Wang et al. 1998). It represents the most common type of  
11 genetic variations accounting approximately 90% of all polymorphism (Collins et al. 1997;  
12 Kwok 2001).

13 In plants, SNPs can be used as genetic markers: for many breeding applications such  
14 as variety identification, for population studies, for germplasm fingerprinting, for gene  
15 mapping, for genotype/phenotype association, and for positional-cloning studies. Plants offer  
16 unique challenges for genotyping studies in that the majority of cultivated species are  
17 polyploid and have extremely large genomes (Giancola et al. 2006). Appearance of SNP is  
18 different crosswise plant species for example maize is considered highly polymorphic, with  
19 an average of one SNP every 104 bp (Tenaillon et al. 2001) but the level of variation depends  
20 on the locus too (McKham et al. 2004), for example in promoter regions Giancola et al.  
21 (2006) found up to 1 SNP per 12.5 bp, Ching et al. (2002) reported one non-coding SNP per  
22 31 bp and one coding SNP per 124 bp in 18 genes assayed in 36 inbred lines.

23 SNPs have now been developed for genotyping in plants (Buckler et al. 2001).  
24 Chiapparino et al. (2004) used SNPs for barley varieties identification and they were able  
25 unambiguously identified, with usage of five SNPs, a set of 132 cultivated varieties and  
26 Shirasawa et al. (2006) developed more preciously Dot-blot SNP analysis for variety  
27 identification. Rickett et al. (2003) analyzed 17 tetraploid and 11 diploid potato genotypes. In  
28 this study 78 genomic DNA fragments with an overall length of 31 kb were comparatively  
29 sequenced and 1498 SNPs were identified, which corresponded, to one SNP every 21 bp. They  
30 also gathered lower nucleotide diversity in tetraploid genotypes than in diploid genotypes.  
31 SNPs can mark functionally important allelic differences, and SNPs that flag individual  
32 alleles of known genes have been used widely as molecular markers. Sattarzadeh et al. (2006)  
33 used SNPs as basis for developing a PCR-based marker for detection resistance to *Globodera*  
34 *pallida* pathotype Pa2/3 in potato varieties.

35 SNP technology is heavily dependent upon sequence data. Several methods are  
36 available for SNP detection including matrix-assisted laser desorption / ionisation time-of-  
37 flight (MALDI-TOF, Griffin and Smith 2000) and a number of techniques that rely on  
38 fluorescence, for example sequencing, Amplifluor® (SerologicalCorp.), TaqMan®,  
39 SnapShot® and SNPlex® (AppliedBiosystems), Illumina® (IlluminaInc.), and chip-based  
40 technologies such as Genechips (Affymetrix; Gut 2004), automated fluorescent sequencing  
41 denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC, Underhill et al. 1996), DNA  
42 micro arrays (Hacia and Collins 1999), single-strand conformational polymorphic-capillary  
43 electrophoresis (SSCP-CE, Ren 2001), micro plate-array diagonal-gel electrophoresis  
44 (MADGE, Day et al. 1998).

45

#### 46 TRANSPOSONES AND RETROTRANSPOSONES

47 McClintock detected the presence of transposable elements in maize (*Zea mays* L.) in  
48 1950. Transposable elements are useful molecular genetic tools for mutating and identifying  
49 genes, and a large number of genes have been isolated by using endogenous transposones as  
50 tags (Walbot 1992). Transposable elements can be categorized into two major classes, DNA-

1 type transposable elements and retrotransposons. DNA-type transposable elements include  
2 the well-characterized Ac/Ds (Activator/Dissociation) (Freoroff et al. 1983; Döring et al.  
3 1984; Sutton et al. 1984), En/Spm (Enhancer/Suppressor-mutator) (Pereira et al. 1985;  
4 Masson et al. 1987) and Mu (Mutator) (Alleman and Freeling 1986; Lisch 2002). While a  
5 DNA-type transposable element transposes through self-excision and subsequent re-insertion,  
6 a retrotransposon transposes after it is transcribed and reverse-transcribed, by means of a  
7 copy-and-paste mechanism (Boeke and Corces 1989). Retrotransposons consist of two  
8 subclasses of elements, long-terminal repeat (LTR) and non-LTR retrotransposons, and the  
9 former are further subdivided into two groups – Ty1/*copia* type and Ty3/*gypsy* type (Xiong  
10 and Eickbusch 1990). Ty1/*copia* LTR retrotransposons contain open reading frames (ORFs)  
11 corresponding to retroviral *gag* and *pol* genes and have functional domains in *pol* ordered  
12 protease (PR), integrase (in), RNA-dependent DNA polymerase (RT) and RNase H (RH).  
13 Mobile genetic element retrotransposons generally show widespread chromosomal dispersion,  
14 variable copy number and random distribution in the genome (Kumar et al. 1997; Kalendar et  
15 al. 1999). Retrotransposons are the most common class of eukaryotic transposable elements.  
16 Retrotransposons move to new chromosomal locations via an RNA intermediate and insert  
17 new cDNA copies back into the genome (Boeke et al 1985; Bingham and Zachar 1989;  
18 Finnegan 1989). This mode of replication increases genome size and contributes significantly  
19 to the total DNA of higher plants, e.g. 50% of the maize genome is composed of  
20 retrotransposons (Shirasu et al. 2000). To extend the transposon tagging strategy to plant  
21 species in which endogenous transposable elements have not yet been isolated, transformation  
22 techniques can be employed to introduce one of the characterized transposable elements  
23 (Haring et al. 1991). However, these tools were initially available only in a limited number of  
24 species with active endogenous transposable elements. The dispersion (Katsiotis et al. 1996;  
25 Suoniemi et al. 1996), ubiquity (Flavell et al. 1992; Voytas et al. 1992) and prevalence  
26 (Pearce et al. 1996; 1997) of retrotransposon-like elements in plant genomes can be exploited  
27 for DNA-fingerprinting. Two DNA techniques based on retrotransposon-like elements were  
28 introduced by Kalendar et al. (1999). REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified  
29 Polymorphism) is a method based on polymerase chain reaction-mediated amplification of the  
30 region between a long terminal repeat of a retrotransposon and a nearby microsatellite (Kahl  
31 2001). IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) markers are generated by the  
32 proximity of two retrotransposon using outward facing primers annealing to their long  
33 terminal repeats (LTRs) (Kalendar et al. 1999). Application of IRAP and REMAP have been  
34 demonstrated to provide suitably polymorphic markers for variety identification or breeding  
35 purposes (Kalendar et al. 1999; Manninen et al. 2000; Vicient et al. 2001; Boyko et al. 2002).  
36 RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) is a four-primer technique that will  
37 amplify two bands from the 5' and 3' ends of a retrotransposon, if this is present, or a single  
38 band if the retrotransposon is absent. This technique requires knowledge of the genomic DNA  
39 region surrounding the retrotransposon, and allows analysis of a single locus at a time, but is  
40 designed in such a way as to include an internal control system, and is the only one which  
41 allows clear identification of heterozygotes (Flavell et al. 1998). This method was used by  
42 Flavell et al. (2001) for Pisum, Vitte et al. (2004) for rice and Bežo et al. (2006) for potato  
43 and flax.

44 Alternatively, retrotransposons can be used in an AFLP-type reaction (Vos et al.  
45 1995), called Sequence-Specific Amplified Polymorphism S-SAP (Vaugh et al. 1997). In the  
46 S-SAP technique, the selective bases added to the primers reduced the complexity of the  
47 amplified DNA, depending on the copy number of the retrotransposon targets. The use of S-  
48 SAP has been described for barley (Vaugh et al. 1997), wheat (*Triticum aestivum* L.)  
49 (Gribbon; et al. 1999), pea (*Pisum sativa* L.) (Ellis et al. 1998) and alfalfa (*Medicago sativa*  
50 L.) (Porceddu et al. 2002).

1  
2 CONCLUSIONS  
3

4 There is no doubt that the modern techniques described in this paper provide a highly  
5 discriminating approach to potato variety verification. Some of these methods have already  
6 found widespread use and acceptance within certain sectors of the seeds industry. Before the  
7 maximum benefit can be derived from these approaches, there is a need for further research  
8 into methodology and for the development of techniques that are rapid, robust, reliable, cost-  
9 effective and can be subjected to standardization. A wider range of crops needs to be  
10 examined, along with more extensive collections of varieties. The uniformity and stability of  
11 varieties, particularly with respect to the newer DNA profiling techniques, need to be studied.  
12 Science and technology do not stand still and organizations such as ISTA need mechanisms in  
13 place to ensure that they are kept fully up to date with developments. Overall, more research  
14 is needed with regard to all of these new approaches. For the molecular markers especially, a  
15 wider range of genotypes needs to be examined and more information is required in regard to  
16 the uniformity and stability of the markers. It is clear, however, that, given the wider use of  
17 more genetically-based plant breeding and the emphasis on quality control at all stages, new  
18 approaches to variety identification are going to increase in importance in the future.

19 Molecular markers assist the transfer of useful genes and permit the selection of  
20 superior genotypes even for an allogamous, tetraploid species such as potato. In various  
21 examples so far reported in potato breeding, both positive and negative selection has been  
22 used, thus improving the transfer of genes. The increasingly widespread availability of  
23 molecular markers linked to single resistance genes and to QTLs for yield and qualitative  
24 traits may offer many new potential applications for the MAS in the production of new  
25 commercially available potato varieties.

26 A variety of molecular markers have been successfully applied to potato genetic  
27 resources at low taxonomic levels to study diversity and taxonomy, and to search for effective  
28 fingerprinting tools. Each system has advantages and disadvantages, depending on the genetic  
29 distance of the populations examined and the nature of the question addressed.

30  
31 **Acknowledgement**  
32

33 This study was supported by Project No. NAZV 1B44011 of the Ministry of  
34 Agriculture of the Czech Republic and MSM6007665806 of the Ministry of Education of the  
35 Czech Republic. We thank Dr. Keith Edwards for critical reading the manuscript.  
36

37 **References**  
38

- 39 Ainsworth CC, Sharp PJ (1989) The potential role of DNA probes in plant variety  
40 identification. *Plant Varieties and Seeds* 2:27-34  
41 Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) Length polymorphism of simple sequence  
42 repeat DNA soybean. *Genetics* 132:1131-1139  
43 Alleman M, Freeling M (1986) The *Mu* transposable elements of maize: evidence for  
44 transposition and copy number regulation during development. *Genetics* 112:107-119  
45 Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hiller J, Veilleux E (2001) Development of  
46 microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses.  
47 *Genome* 44:50-62  
48 Ballvora A, Hesselbach J, Niewohner J, Leister D, Salamini F, Gebhardt C (1995) Marker  
49 enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the  
50 nematode resistance gene *Gro1*. *Mol Gen Genet* 249(1):82-90

- 1 Barcaccia G, Tavoletti S, Mariani A, Veronesi F (2003) Occurrence, inheritance and use of  
2 reproductive mutants in alfalfa improvement. *Euphytica* 133(1):37-56
- 3 Barone A (2004) Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Am J Potato Res*  
4 81(2):111-117
- 5 Becker J, Heum M (1995) Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol*  
6 *Biol* 27:835-845
- 7 Bežo M, Hrubíková K, Štefanová V, Žiarovská J, Bežo M ml, Candráková A (2006) Plant  
8 germplasm evaluation retrotransposons and microsatellites. *Biotechnology 2006*, Scientific  
9 Pedagogical Publishing, České Budějovice, pp.123
- 10 Bingham PM, Zachar Z (1989) Retrotransposons and *FB* elements from *Drosophila*  
11 *melanogaster*. In: *Mobile DNA* (ed) Berg DE, Howe MM, American Society of  
12 Microbiology, Washington DC, pp.485-502
- 13 Boeke JD, Corces VG (1989) Transcription and reverse transcription of retrotransposons.  
14 *Annu Rev Microbiol* 43:403-34
- 15 Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA, Fink GR (1985) *Ty* elements transpose through an RNA  
16 intermediate. *Cell* 40:491-434
- 17 Boniebale MW, Plaisted RL, Pindela O, Tanksley SD (1994) QTL analysis of trichome-  
18 mediated insect resistance in potato. *Theor Appl Genet* 87: 973-987
- 19 Boniebale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1998) RFLP maps based on a common set of  
20 clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103
- 21 Boyko E, Kalendar R, Korzun V, Korol A, Schulman AH, Gills BS (2002) A high-density  
22 cytogenic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defence  
23 related genes: insight into cereal chromosome structure and function. *Plant Mol Biol* 48:767-  
24 790
- 25 Bryan GJ, Collins AJ, Stephenson P, Orry A, Smith JB, Gale MD (1997) Isolation and  
26 characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet* 94:557-563
- 27 Buckler ES, Thornsberry JM, Kresovich S (2001) Molecular diversity, structure and  
28 domestication of grasses. *Genet. Res.* 77:213-218.
- 29 Callow JA, Foed-I.loyd BV, Newbury HJ (1997) *Plant genetic resource-conservation and use*.  
30 CAB, Wallingford, UK
- 31 Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, Macaulay M, Marshall D, Waugh R (2000)  
32 Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence  
33 repeats in plants. *Genetics* 156(2):847-854
- 34 Chakrabarti SK, Birham RK, Pattanayak D (1998) Identification and genetic similarity  
35 analysis of Indian potato cultivar by random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Indian J*  
36 *Exp Biol* 37:1123-1128
- 37 Chakrabarti SK, Pattanayak D, Naik PS (2001) Fingerprinting Indian potato cultivars by  
38 random amplifies polymorphic DNA (RAPD) markers. *Potato Res* 44 (4):375-387
- 39 Chakrabarti SK, Pattanayak D, Sarmat D, Chimote VP, Naik PS (2006) Stability of RAPD  
40 fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biol Plantarum* 50(4):531-536
- 41 Charters YM, Robertson A, Wilkinson MJ, Ramsay G (1996) PCR analysis of oilseed rape  
42 cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Olifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR)  
43 primers. *Theor Appl Genet* 92:442-447
- 44 Chase RW (1989) North American potato variety inventory. Certification Section Potato  
45 Association of America, Orono, ME, USA
- 46 Chiapparino F, Lee D, Donini P. (2004) Genotyping single nucleotide polymorphisms in  
47 barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47:414-420
- 48 Ching A, Caldwell KS, Jung M, Dolan M, Smith OS, Tingey S, Morgante M, Rafalski AJ  
49 (2002) SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize  
50 inbred lines. *BMC Genet.* 3: 19. doi: 10.1186/1471-2156-3-19

1 Cho RJ, Mindrinos M, Richards DR, Sapolsky RJ, Anderson M, Drenkard E, Dewdney J,  
2 Reuber TL, Stammers M, Federspiel N, Theologis A, Yang WH, Hubbell E, Au M, Chung  
3 EY, Lashkari D, Lemieux B, Dean C, Lipshutz RJ, Ausubel FM, Davis RW, Oefner PJ  
4 (1999) Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet.*  
5 23, 203-207

6 Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A (1997) Variations on a theme: Cataloging human DNA  
7 sequence variation. *Science* 278. 1580-1581

8 Cooke RJ (1995) Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. *J Chromat*  
9 698:281-299

10 Cooke RJ (1999) Modern methods for cultivar verification and the transgenic plant challenge.  
11 *Seed Sci Technol* 27:669-680

12 Cooke RJ, Reeves JC (1998) New approaches to potato variety identification. *Potato Res*  
13 42:529-539

14 Coombs JJ, Frank LM, Douches DS (2004) An applied fingerprinting system for cultivated  
15 potato using simple sequence repeats. *Am J Potato Res* 81(4):243-250

16 Cooper DN, Smith BA, Cookc HJ, Niemann S, Schmidtke J (1985) An estimate of unique  
17 DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum.Genet.* 69(3): 201-205

18 Davila JA, Sanchez de la Hoz MP, Lorce Y, Ferrer E (1998) The use of random amplified  
19 microsatellite polymorphic DNA and coefficient of parentage to determine genetic  
20 relationship in barley. *Genome* 41:477-486

21 Day IN, Spanakis E, Palamand D, Weavind GP, O'Dell SD (1998) Microplate-arrays  
22 diagonal-gel electrophoresis (DADGE) and melt-MADGE: tool for molecular genetic  
23 epidemiology. *Trends in Biotech.* 16: 187-290

24 De Jung H, Kawchuk LM, Coleman WK, Verhaeghe CA, Russel L, Burns VJ, Tremblay-  
25 Deveau F (2001) Development and characterization of an adapted form of *Droppy*, a diploid  
26 potato mutant deficient in abscisic acid. *Am J Potato Res* 78:279-290

27 Demcke T, Kawchuk LM, Lynch DR (1993) Identification of potato cultivars and clonal  
28 variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Am Pot J* 70:561-569

29 Desborough S, Peloquin SJ (1968) Potato variety identification by use of electrophoretic  
30 parents of tuber proteins and enzymes. *Am Pot J* 45:220-229

31 Döring HP, Tillmann E, Starlinger P (1984) DNA sequence of the maize transposable  
32 element dissociation. *Nature* 307:127-130

33 Edwards KJ, Barker JIA, Dayl A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched  
34 for several microsatellite sequence in plants. *Biotechniques* 20:758-760

35 Ellis THN, Turner L, Hellens RP, Lee D, Harker CL, Enard C, Domoney C, Davies DR  
36 (1998) Linkage maps in Pea. *Genetics* 130:649-663

37 European Commission (2007) Common catalogue of varieties of agricultural plant species –  
38 26th complete edition. Official Journal of the European Union, 2007/C 304 A/01, Vol. 50:1-  
39 530

40 Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and evolution. *Trends Genet* 5:103-107

41 Fischer PJ, Gardner RC, Richardson TE (1996) Single locus microsatellite isolation using  
42 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Res* 24(21):4369-4371

43 Flavell AJ, Dunabar F, Anderson R, Pearce SR, Hartley R, Kumar A (1992) *Ty1-copia* group  
44 retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res*  
45 20:3639-3644

46 Flavell AJ, Knox MR, Ellis THN (2001) Marker analysis in *Pisum* using SSAP and RBIP  
47 genetic markers based on the *PDR1* retrotransposon. Plant and Animal Genome, IX  
48 Conference, San Diego, California

49 Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR, Ellis THN (1998) Retrotransposon-based insertion  
50 polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J* 16(5):643-650



1 Ford R, Taylor PWJ (1997) The application of RAPD markers for potato cultivar  
2 identification. *Aust J Agr Res* 48:1213-1217

3 Freoroff N, Wessler S, Shure M (1983) Isolation of the transposable maize controlling  
4 elements *Ac* and *Ds*. *Cell* 35:235-242

5 Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P, Schiller K (1994) Assessing  
6 genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case  
7 study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type.  
8 *Mol Breed* 13:93-102

9 Gebhardt C, Blomendahl C, Schachtchabel U, Debener T, Salamini F, Ritter E (1989a)  
10 Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum* ssp.  
11 *tuberosum*) with RFLP fingerprinting. *Theor Appl Genet* 78: 16-22

12 Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debener T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann II,  
13 Thompson RD, Bonierbale MW, Ganai MW, Tanksley SD, Salamini F (1991) RFLP maps of  
14 potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theor Appl Genet* 83:49-57

15 Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtchabel U, Walkemeier B, Uhrat H, Salamini F  
16 (1989b) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* 78:  
17 65-75

18 Gebhardt C, Valkonen JPT (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the  
19 potato genome. *Ann Rev Phytopatol* 39:79-102

20 Ghislain M, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Waugh R, Bonierbale M (2000)  
21 Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. *Research on Potato*,  
22 CIP Program Report 1999-2000, pp167-174

23 Ghislain M, Spooner DM, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Vásquez C, Waugh R,  
24 Bonierbale M (2004) Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs)  
25 for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet* 108:881-890

26 Giancola S, McKhann III, Berard A, Camilleri C, Durand S, Iibeau P, Roux F, Rehoud X,  
27 Gut IG, Brunel D. (2006) Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods,  
28 the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theor Appl Genet*  
29 112:1115-1124

30 Görg R, Schachtschabel U, Ritter E, Salamini F, Gebhardt C (1992) Discrimination among  
31 136 tetraploid potato variety by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop*  
32 *Sci* 32:815-819

33 Gribbon BM, Pearce SR, Kalendar, R Schulman AII, Paulin L, Jack P, Kumar A, Flavell AJ  
34 (1999) Phylogeny and transpositional activity of *Tyl-copia* group retrotransposons in cereal  
35 genomes. *Mol Gen Genet* 261:883-891

36 Griffin TJ, Smith I.M (2000) Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass  
37 spectrometry. *Trends in Biotechnol.* 18: 77-84

38 Gut IG (2004) An overview of genotyping and single nucleotide polymorphisms (SNP). In:  
39 Rapley R, Harbron S (eds) *Molecular analysis and genome discovery*. Wiley, Chichester,  
40 pp43-64

41 Hacia JG, Collins FS (1999) Mutational analysis using oligonucleotide microarrays.  
42 *J.Med.Genet.* 36: 730-736

43 Hamalainen JI, Watanabe KN, Valkonen JPT, Arihara A, Plaisted RI., Pehu E, Miller I.,  
44 Slak SA (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to  
45 potato virus Y. *Theor Appl Genet* 94:192-197

46 Hamester W, Hils U (eds) (2003) *World Catalogue of Potato Varieties*. Que Pub,  
47 Indianapolis, IN

48 Hantula J, Dusabenyasani M, Hamelin RC (1996) Random amplified microsatellites  
49 (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur J Path*  
50 26:159-166

1 Haring MA, Rommens CMT, Nikamp IIIJ, Hille J (1991) The use of transgenic plants to  
2 understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies. *Plant Mol*  
3 *Biol* 16:449-461

4 Hils U, Pieterse I. (2007) World Catalogue of Potato Varieties 2007 [Weltkatalog der  
5 Kartoffelsorten 2007], Agrimedia, pp. 253

6 Hosaka K, Mori M, Ogawa K (1994) Genetic relationships of Japanese potato cultivars  
7 assessed by RAPD analysis. *Am Pot J* 71: 535-546

8 Hüttel B, Winter P, Weising P, Choumane W, Weigand F, Kahl G (1999) Sequence-tagged  
9 microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arictinum* L.). *Genome* 42:210-217

10 Hutvagner G, Banfalvi Z, Milankovics I, Šilhavý D, Polagr Z, Horvath S, Wolters P, Nap JP  
11 (2001) Molecular markers associated with leptine production are located on chromosome 1 in  
12 *Solanum chacoense*. *Theor Appl Genet* 102: 1065-1071

13 Ispizua VN, Guma IR, Feingold S, Clausen AM (2007) Genetic diversity of potato landraces  
14 from northwestern Argentina assessed with simple sequence repeats (SSRs). *Gen Res. Crop*  
15 *Evol.* 54:1833-1848.

16 Kahl G (2001) The dictionary of Gene Technology. Wiley-VCH, Weinheim

17 Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two  
18 new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet* 98:704-711

19 Kantety RV, Zeng XP, Bennetzen JL, Zehr BE (1995) Assessment of genetic diversity in dent  
20 and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR)  
21 amplification. *Mol Breed* 1:365-337

22 Kardolus JP, Van Eck BJ, Van den Berg RG (1997) The potential of AFLPs in  
23 biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). *Pl Syst Evol* 210:87-  
24 103

25 Karp A, Edwards KJ, Bruford M, Funk S, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kremer A,  
26 Boursot P, Arctander P, Tautz D, Hewitt GM (1997) Molecular technologies for biodiversity  
27 evaluation: opportunities and challenges. *Nat Biotechnol* 15: 625-628

28 Karp A, Seberg O, Buiatti M (1996) Molecular techniques in the assessment of botanical  
29 diversity. *Ann Bot* 78:143-149

30 Katsiotis A, Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1996) Chromosomal and genomic organization  
31 of *Tyl-copia*-like retrotransposon sequences in the genus *Avena*. *Genome* 39:410-417

32 Kawchuk LM, Lurch DR, Thomas J, Penner B, Sillito D, Kulcsar F (1996) Characterization  
33 of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar  
34 identification. *Am Pot J* 73:325-335

35 Kijas JMH, Fowler JCS, Gage CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from  
36 the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated  
37 magnetic particles. *Biotechniques* 16(4):656

38 Kim HS, Ward RW (1997) Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum*  
39 *aestivum* L. em. *Theko.*) based on RFLPs and coefficient of paternity. *Theor Appl Genet*  
40 94:472-479

41 Kuhl JS, Hanneman RE Jr, Havey MJ (2001) Characterization and mapping of *Rpi 1*, a late-  
42 blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol Genet*  
43 *Genomics* 265:977-985

44 Kumar A, Pearce SR, McLean K, Harrison G, Heslop-Harrison JS, Waugh R, Flavell AJ  
45 (1997) The *Tyl-copia* group of retrotransposon in plants: genomic organisation, evolution,  
46 and use as molecular markers. *Genetica* 100:205-217

47 Kwok PY (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Ann Rev*  
48 *Genom Hum Genet* 2001, 2:235-258

49 Lagercrantz U, Ellegren H, Anderson L (1993) The abundance of various polymorphic  
50 microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res* 21:1111-1115

1 Lagoda PJ, Dambier D, Grapin A, Lanaud C, Noyer JL (1998) Nonradioactive sequence-  
2 tagged microsatellite site analysis: A Method transferable to the tropics. *Electrophoresis* 19:  
3 152-157

4 Law JR, Domini P, Koebner RMD, Reeves JC, Cooke RJ (1998) DNA profiling and plant  
5 variety registration. 3: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified  
6 fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102: 335-342

7 Lee D, Reeves JC, Cooke RJ (1996) DNA profiling and plant variety registration: 2.  
8 Restriction fragment length polymorphisms in varieties of oilseed rape. *Plant Varieties and*  
9 *Seeds* 9:181-190

10 Lisch D (2002) Mutator transposons. *Trends Plant Sci* 7:498-504

11 Long AD, Lyman RF, Langley CH, Mackay TFC (1998) Two sides in the Delta gene region  
12 contribute to naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*.  
13 *Genetics*, 149, 999-1017

14 Mandolino G, De Marco S, Faeti V, Bagatta M, Carboni A, Ranalli P (1996) Stability of  
15 fingerprints of *Solanum Tuberosum* plants derived from conventional tubers and microtubers.  
16 *Plant Breed* 115:439-444

17 Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman AH (2000) Application of *BARE-1*  
18 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley.  
19 *Mol Gen Genet* 264:325-334

20 Mansfield ES, Robertson JR, Vanish M, Isenberg AR, Frazier RR, Ferguson K, Chow S,  
21 Hartus DW, Barker DL, Gill PD, Budowle B, McCord BR (1998) Analysis of multiplexed  
22 short tandem repeat (STR) system using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 19:  
23 101-107

24 Marczewski W, Henning J, Gebhardt C (2002) The potato virus S resistance gene *Ns* maps to  
25 potato chromosome VIII. *Theor Appl Genet* 105:564-567

26 Masson P, Surosky R, Kingsbury JA, Fedoroff NV (1987) Genetics and molecular analysis of  
27 the *Spm*-dependent *a-m2* alleles of the maize *a* locus. *Genetics* 177:117-137

28 McGregor CE, Lambert CA, Greyling MM, Louw JH, Warnich L (2000) A comparative  
29 assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid  
30 potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113: 135-144

31 McGregor CE, Van Treuren R, Hoekstra R, van Hintum ThJL (2002) Analysis of the wild  
32 potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLPs: implications for ex situ conservation.  
33 *Theor Appl Genet* 104:146-156

34 McKhann HI, Camilleri C, Berard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, LeCorre V,  
35 Caloustian C, Gut IG, Brunel D (2004) Nested core collections maximizing genetic diversity  
36 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38:193-202

37 Mekssem K, Leister D, Peleman J, Zabcau M, Salamini F, Gebhardt C (1995) A high  
38 resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and  
39 AFLP markers. *Mol Gen Genet* 249(1):74-81

40 Meyer S, Nagel A, Gebhardt C (2005) PoMaMo—a comprehensive database for potato  
41 genome data. *Nucleic Acids Res.* 33:D666-D670

42 Milbourne D, Meyer RC, Bradshaw JE, Barid E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R  
43 (1997) Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationship in  
44 cultivated potato. *Mol Breed* 3: 127-136

45 Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R (1998) Isolation,  
46 characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet*  
47 259:233-245

48 Mitchell SE, Kresovich S, Jester CA, Hernandez CJ, Swecz-McFadden A (1997) Application  
49 of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing for genotyping plant  
50 genetic resource. *Crop Sci* 37:617-624

- 1 Moisan-Thierry M, Marhadour S, Kerlan MC, Dessenne N, Perramant M, Gokelaere T, Le  
2 Hingrat Y (2005) Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR).  
3 *Potato Res.* 48:191-200
- 4 Monica MR, Boris SD, Julio KB (2007) Use of SSR markers to identify potato germplasm in  
5 the INIA Chile breeding program. *Agric. Tech.* 67:3-15
- 6 Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.  
7 *Plant J* 3:175-182
- 8 Niewohner J, Salamini F, Gebhardt C (1995) Development of PCR assays diagnostic for  
9 RFLP marker alleles closely linked to alleles *Grol* and *H1*, conferring resistance to the root  
10 cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol Breed* 1:57-78
- 11 Organisyan AS, Kochieva EZ, Ryskov AP (1996) Fingerprinting potato species and cultivars  
12 by the RAPD-PCR method. *Genetika* 32:448-451
- 13 Paterson AH, Tanksley SD, Sorrells ME (1991) DNA markers in plant improvement. *Adv*  
14 *Argon* 46: 39-90
- 15 Pattanayak D, Chakrabarti SK, Naik PS (2002) Genetic diversity of late blight resistant and  
16 susceptible Indian potato cultivars revealed by RAPD markers. *Euphytica* 128:183-189
- 17 Pearce SR, Harrison G, Li D, Heslop-Harrison JS, Flavell AJ, Kmar A (1997)  
18 Characterisation and genomic organization of the *Tyl-copia* group retrotransposons in rye  
19 (*Secale cereale*). *Genome* 40:617-625
- 20 Pearce SR, Harrison G, Li D, Heslop-Harrison JS, Kmar A, Flavell AJ (1996) The *Tyl-copia*  
21 group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and  
22 chromosomal localization. *Mol Gen Genet* 250:305-315
- 23 Pereira A, Schwarz-Sommer Z, Gicrl A, Bertram I, Peterson PA, Saedler H (1985) Genetic  
24 and molecular analysis of the Enhancer (*En*) transposable elements system of *Zea mays*.  
25 *EMBO J* 4:17-23
- 26 Plaschke J, Ganai MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related  
27 beard wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91:1001-1007
- 28 Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, Falcinelli M (2002) Linkage mapping in apomictic and  
29 sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two-way pseudo-tester  
30 strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor Appl Genet* 104:273-280
- 31 Provan J, Powell W, Waugh R (1996) Microsatellite analysis of relationships within  
32 cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet* 92:1078-1084
- 33 Rafalski JA (2002) Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches.  
34 *Plant Sci* 162: 329-333
- 35 Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites  
36 and machines. *Trends Genet* 8(9):275-280
- 37 Reid A, Kerr EM (2007) A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method  
38 for potato cultivars. *Plant Genetic Resources* 5:7-13
- 39 Ren J, (2001) High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary  
40 electrophoresis. *J.Chromatography B.Biomed.Science Appl.* 74: 115-128
- 41 Röder MS, Plaschke J, Konin SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW (1995)  
42 Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet*  
43 246:327-333
- 44 Rout GR, Mohapatra A, Jain SM (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical  
45 review on present scenario and future prospects. *Biotechnol Adv* 24(6): 531-560
- 46 Sattarzadch A, Achenbach U, Lubeck J, Strahwald J, Tacke E, Hoffert HR, Rothsteyn T,  
47 Gebhardt C (2006) Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for  
48 developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to  
49 *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol Breeding* (2006)18:301-312

1 Schneider K, Douches DS (1997) Assessment of PCR-based simple sequence repeats to  
2 | fingerprint North American potato cultivars. *Am Potato J* 74:149-160  
3 Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T (2006) Dot-blot-SNP analysis  
4 for practical plant breeding and cultivar identification in rice. *Theor Appl Genet* (2006) 113:  
5 147-155  
6 Shirasu K, Schulman AS, Lahaye T, Schulze-Lefert P (2000) A contiguous 66-kb barley  
7 | DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res* 10:908-915  
8 Sorensen KK, Kirk HG, Olsson K, Labouria R., Christiansen J (2008) A major QTL and an  
9 SSR marker associated with glycoalkaloid content in potato tubers from *Solanum tuberosum*  
10 x *S. sparsipilum* located on chromosome I. *Theor. Appl. Genet.* 117:1-9  
11 Sosinski B, Douches DS (1996) Using polymerase chain reaction based DNA amplification to  
12 fingerprint North American potato cultivar. *Hort Sci* 31:130-133  
13 Staub JE, Serquen FC, Gupta M (1996) Genetic markers, map construction and their  
14 application in plant breeding. *Hort Sci* 31: 729-741  
15 Suoniemi A, Narvanto A, Schulman AH (1996) The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in  
16 barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Mol Biol* 31:295-306  
17 Sutton WD, Gerlach WL, Schwartz D, Peacock WJ (1984) Molecular analysis of *Ds*  
18 controlling element mutations at the *Adh1* locus of maize. *Science* 223:1265-1268.  
19 Tanksley SD, Zouny ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant  
20 | breeding: new tools for an old science. *Bio Technol* 7:257-264  
21 Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut RL, Doebley JF, Gaut BS (2001) Patterns of  
22 DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proc*  
23 *Natl Acad Sci USA* 98: 9161-9166  
24 Underhill PA, Jin L, Zemans R, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL (1996) A pre-Columbian Y  
25 chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history.  
26 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 196-200.  
27 Van den Berg B (1997) Horizontal ultrathin-layer multi-zonal electrophoresis of DNA: An  
28 efficient tool for large-scale polymerase chain reaction (PCR) fragment analysis.  
29 *Electrophoresis* 18:2861-2864  
30 Van den Berg R, Bryan G, Del Rio A, Spooner D (2002) Reduction of species in the wild  
31 potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR  
32 data. *Theor Appl Genet* 105(8):1109-1114  
33 Van der Voort JK, Van Eck HJ, Draaistra J, van Zandvoort PM (1998) An online catalogue of  
34 AFLP markers covering the potato genome. *Mol Breed* 4:73-77  
35 Van Eck HJ, Jacobs JEM, Stam P, Ton J, Stiekema WJ, Jacobs E (1994) Multiple alleles for  
36 tuber shape in dioploid potato detected by quantitative and qualitative genetic analysis using  
37 RFLPs. *Genetics* 137: 303-309  
38 Van Eck HJ, Van der Voort JK, Draaistra J, van Zandvoort P, van Enckevort E, Segers B,  
39 Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J (1995) The inheritance and chromosomal  
40 localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed* 1:397-410  
41 Van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrera I, Bryan GJ, Caromel B, Ghareeb B, Isidore E,  
42 Jong W, Koert P, Lefebvre V, Milbourne D, Ritter E, Voort JNAMR, Roussele-Bourgeois F,  
43 Vliet J, Waugh R, Visser RGF, Bakker J, Eck HJ (2006) Construction of a 10,000-Marker  
44 Ultradense Genetic Recombination Map of Potato: Providing a Framework for Accelerated  
45 Gene Isolation and a Genomewide Physical Map. *Genetics* 173:1075-1087  
46 Van Treuren R, Magda A, Hoekstra R, van Hintum ThJL. (2004) Genetic and economic  
47 aspects of marker-assisted reduction of redundancy from a wild potato germplasm collection.  
48 *Genet Res Crop Ev* 51:277-290

1 Vicient CM, Kalendar R, Schulman AII (2001) Envelope-class retrovirus-like elements are  
2 widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Res*  
3 11:2041-2049

4 Vitte C, Lamy F, Ishii T, Brar DS, Panaud O (2004) Genomic paleontology provides evidence  
5 for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa*, L.). *Mol Gen Genom* 272:504-511

6 Vos P, Hogers R, Blecker M, Reijans M, van de Lee T, Homes M, Freijters A, Pot J, Peleman  
7 J, Kuiper M, Zebau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic*  
8 *Acids Res* 23(21):4407-4414

9 Voytas DF, Cummings MP, Koniczny A, Ausubel FM, Rodecma SR (1992) *Copia*-like  
10 retrotransposon are ubiquitous among plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7124-7128

11 Walbot V (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and  
12 T-DNA insertional mutagenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:49-82

13 Wang Z, Weber JL, Zhang G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA  
14 repeats. *Theor Appl Genet* 88:1-6

15 Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N,  
16 Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsieh L, Topaloglu I, Hubbel E, Robinson E,  
17 Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TS,  
18 Lander ES (1998) Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide  
19 Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 280: 1077-1082

20 Waugh R, Bonar N, Baier E, Thomas B, Graner A, Hayes P, Powell W (1997) Homology of  
21 AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol Gen Genet* 255(3):311-321

22 Weising K, Nyvém II, Wolff K, Mayer W (1995) DNA Fingerprinting in Plant and Fungi.  
23 CRC press, Boca Raton, Ann argot, London, Tokyo, 322p

24 Weising K, Winter P, Huttel B, Kahl G (1998) Microsatellite markers for molecular breeding.  
25 *J Crop Prod* 1:113-143

26 Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.  
27 *Nucleic Acids Res* 18:7213-7218

28 Williams CE, Wielgus SM, Haberlach GT, Guenther C, Kim-Lee H, Hegelson JP (1993)  
29 RFLP analysis of chromosomal segregation in progeny from an interspecific hexaploid  
30 somatic hybrid between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Genetics* 135:167-1173

31 Xiong Y, Eickbusch TH (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their  
32 reverse transcriptase sequence. *EMBO J* 9:3353-3362

33 Yencho GC, Bonierbale MW, Lingey WM, Plaisted RL, Tanksley SD (1996) Molecular  
34 markers locate genes for resistance to Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in  
35 hybrid *Solanum tuberosum* x *S. berthaultii* potato progenies. *Entomol Exp Ann* 81:141-154

36 Young ND (1999) A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 5:  
37 505-510

38 Zietkiewics E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence  
39 repeat (SSR)-anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183

40  
41  
42  
43  
44

**7.2. Utilization of molecular markers based on microsatellites  
polymorphism for potato variety identification cultivated in CR  
Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V.**

**Utilization of DNA markers based on microsatellite polymorphism for identification of potato varieties cultivated in the Czech Republic**

**Využití DNA markerů založených na polymorfismu mikrosatelitů pro identifikaci odrůd brambor pěstovaných v ČR**

**Alena Nováková\*, Kateřina Šimáčková, Jan Bárta, Vladislav Čurn**  
Biotechnological centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia,  
Studentská 13, České Budějovice, Czech Republic, e-mail: [alena.n@seznam.cz](mailto:alena.n@seznam.cz),  
Tel.: 00420387772586, Fax: 0042387772588



#### ABSTRACT

In the year 2007, there were one hundred and seventy-eight potato varieties enlisted in the Czech list of registered potato varieties. The classical morphometric approach to characterization is not effective for such a number of varieties especially for identification at the level of tubers. The needfulness of variety identification at the level of tubers is important mainly for trade aspect. The Czech law no.110/1997 Sb. about the food-stuff and tobacco products and the consequential ordinance (MZe č. 332 / 1997 Sb.) require guarantee of variety declaration in commercial relation for table potato.

In this study we analyzed twenty potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) cultivated in the Czech Republic. Every variety was represented by four independent replicates. This set of samples was analyzed by methods of PCR-SSR (Simple Sequence Repeats) and PCR-ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). We discovered that both of tested methods afford sufficient polymorphism for variety identification, but the method of PCR-ISSR is not utilizable, because we observed the variability within variety. For outright identification of the whole set of potato varieties cultivated in the Czech Republic we recommend to use SSR, AFLP and retrotransposone-based markers as well as morphological markers.

**KEYWORDS:** PCR-ISSR, PCR-SSR, *Solanum tuberosum* L., variety identification

#### ABSTRAKT

V současné době je v České republice registrováno 178 odrůd brambor (stav roku 2007). Klasická morfometrická charakterizace odrůd přestává být v tomto objemu registrovaných odrůd účinná, obzvláště na úrovni hlíz. Potřeba identifikovat konkrétní odrůdu na úrovni hlíz je přitom nejdůležitější, hlavně z obchodního hlediska. Platný zákon č. 110 / 1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a vyhláška na něj navazující (Vyhláška MZe č. 332 / 1997 Sb.) vyžadují u konzumních brambor garanci odrůdové deklarace při obchodním styku.

Pro studii bylo vybráno 20 odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) pěstovaných v ČR. Každá odrůda byla zastoupena čtyřmi nezávislými opakováními. Tento soubor byl analyzován metodami SSR (*Simple Sequence Repeats*) a ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Zjistili jsme, že obě analýzy založené na polymorfismu mikrosatelitů poskytují dostatečnou variabilitu pro identifikaci odrůd, ale metoda ISSR se nejeví jako vhodná z důvodu zjištění její nestability. Pro jednoznačnou identifikaci celého spektra odrůd brambor pěstovaných v ČR doporučujeme sestavení setu markerů, který by zahrnoval více markerovacích systémů morfologických i molekulárních (SSR, AFLP a markery založené na retrotranspozonech).

**KLÍČOVÁ SLOVA:** identifikace odrůd, PCR-ISSR, PCR-SSR, *Solanum tuberosum* L.

## DETAILED ABSTRACT

Kulturní brambor (*Solanum tuberosum* L.) je celosvětově jednou z nejdůležitějších plodin. Identifikace jednotlivých odrůd je důležitá ve všech stádiích produkce brambor, během šlechtění, procesu registrace, produkce sadby a testování. Tradičním přístupem pro identifikaci odrůd brambor je porovnávání morfologických charakteristik a znaků. Avšak morfologické charakteristiky jsou často založeny multigeně, mají průběžnou expresi a jsou ovlivňovány faktory prostředí; to vše činí z morfologických znaků obtížně opakovatelnou metodu především pro rychlé, přesné, objektivní a opakovatelné závěry.

V molekulární biologii byly vyvinuty nové techniky molekulárních a biochemických markerů. Tyto techniky se stávají užitečným nástrojem pro určení genetické vzdálenosti a umožňují charakterizaci jednotlivých genotypů. Užití molekulárních markerů pro zlepšování odrůd zemědělských plodin bylo plošně aplikováno v poslední dekádě, kdy byly molekulární markery aplikovány pro přesnou identifikaci genetické variability založené na analýzách DNA. To je důležité, protože detekce žádaných znaků není takto ovlivněna faktory prostředí.

Z celkového spektra 178 odrůd brambor pěstovaných v ČR bylo vybráno dvacet odrůd a ty byly analyzovány metodami PCR-ISSR (5 primerů) a PCR-SSR (STM1102, STM2005, STWIN12G, STM3012, STM1106, STM3015).

Výsledky získané analýzou mikrosatelitů byly transformovány do binární matice a po eliminaci monomorfních pruhů byla hodnocena genetická vzdálenost pomocí klastrové analýzy (UPGMA - Unweighted Pair Group Method Averages) a koordinační analýzy PCO (Principal Coordinates Analysis) v programu MVSP (Kovach Comp.Serv.) a STATISTICA 6.0 (Statsoft).

Metoda PCR-SSR se ukázala jako vhodná pro identifikaci odrůd brambor. Statisticky bylo hodnoceno 15 ze 17 možných pozic pruhů. Podarilo se nám odlišit osmnáct z dvaceti sledovaných odrůd (odrůdy Colette (2) a Impala (3) nelze jednoznačně odlišit). Naopak metoda PCR-ISSR se jeví jako nevhodná i přes četný poskytovaný polymorfismus amplifikovaného spektra pruhů, kdy bylo hodnoceno všech 216 možných pozic pruhů, neboť jsme zjistili polymorfismus i uvnitř odrůd.

Na souboru dvaceti odrůd registrovaných v ČR jsme získali fingerprint pomocí šesti SSR a pěti ISSR markerů. Metoda SSR analýzy se ukázala jako vhodná pro potřeby identifikace odrůd a naopak metoda ISSR analýzy, ač poskytuje vyšší polymorfismus, pro účely identifikace odrůd vhodná není, neboť vykazuje variabilitu i v rámci jednotlivých odrůd obdobně jako metoda RAPD analýzy.

## INTRODUCTION

Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important crops worldwide. Potato is an important food crop, it is widely used for livestock feeding, as well as for industrial processing as feedstock for many industrial and food applications. Currently, there are more than 3,200 different potato varieties that are cultivated in over 100 countries worldwide [13].

The identification of individual varieties is important at every stage of their agri-production, during their breeding, registration, seed-production, and

testing processes [11]. The traditional approach to variety identification is composed of the observation and the recording of morphological characters or descriptors. The number of useful descriptors is limited in some species. Guidelines for potatoes consist of 50 characters, 12 of which are concerned with sprouting, along with a series of characters such as plant height, leaf size and various features of the flowers and tubers. Such an approach is undoubtedly successful in the process of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) testing. However, it is less suitable when results are required rapidly, such as for the confirmation of tuber material identification. Furthermore, morphological characters are often multigenic, continuously expressed and influenced by environmental interactions, making it difficult to assess them quickly and objectively, and requiring replication of observation [20].

DUS testing would benefit from the use of molecular markers that have been shown to be more rapid and cost-effective, and some of them have been used to assess genetic diversity in potatoes. Molecular markers in general can also be used as potential techniques for variety identification. Together with advances in molecular biology, several new molecular and biochemical marker techniques will be adopted. These techniques are a powerful tool for determining genetic distinctness and enable characterization of particular genotypes. The first groups of these approaches are techniques based on protein polymorphism. But these techniques have several disadvantages: in addition to the basic disadvantages of storage protein and isozyme analysis, they are available to marker only a limited number of genes (and potential traits), their genome coverage is low, and they are strongly influenced by plant ontogenetic stage and environmental conditions [6]. The second group of markers is based on DNA polymorphism. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, historically the first molecular marker system, has been shown to be a valuable tool for detecting patterns of DNA polymorphism among and within *Solanum* species and for potato variety identification [9]. However, this procedure is laborious, expensive, only a few loci are detected per assay and automation is difficult. The recent DNA marker systems are based on PCR technology, and for this reason are more suitable for routine cultivar identification, due to the small amount of DNA required, and generally fast and simple tests. Several methods were recommended for potato variety identification. These methods include Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [5, 16, 18, 21, 27], Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) [5, 14, 21, 22, 25, 29, 30], microsatellites analyses of Simple Sequence Repeats (SSR) [10, 17, 21, 25] or Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs) [1, 24] and in recent period also analysis of retrotransposones – Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP), Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) and Retrotransposon-Based Insertional Polymorphism (RBIP) techniques [2, 3, 7, 8, 12, 15, 19, 23, 31, 32, 33].

## **MATERIALS AND METHODS**

*Plant material.* We used set of twenty registered potato varieties: Adora (1), Anosta (7), Cicero (8), Cinja (9), Colette (2), Desirée (17), Ditta (Lenka) (15), Impala (3), Javor (18), Karin (10), Komtesa (4), Korneta (11), Kuras (19), Magda

(5), Marabel (12), Pacov (20), Provento (16), Rosara (6), Secura (13), Vineta (14). DNA was extracted by commercial kit Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK) from potato tuber juice [28].

*PCR-SSR analyses.* For PCR-SSR, six primer pairs were selected: STM1102 (5'-GGA AGA ATT TTG TAG GTT CAA - 3', 5'- AAA GTG AAA CTT CCT AGC ATG - 3'), STM2005 (5'- TTT AAG TTC TCA GTT CTG CAG GG - 3', 5'- GTC ATA ACC TTT ACC ATT GCT GGG - 3') [22], STWIN12G (5'- TGT TGA TTG TGG TGA TAA - 3', 5'- TGT TGG ACG TGA CTT GTA - 3') [25], STM3012 (5'- CAA CTC AAA CCA GAA GGC AAA - 3', 5'- GAG AAA TGG GCA CAA AAA ACA - 3'), STM1106 (5'- TCC AGC TGA TTG GTT AGG TTG - 3', 5'- ATG CGA ATC TAC TCG TCA TGG - 3'), STM3015 (5'- AGC AAT AAA GTC AAC ACT CCA TCA - 3', 5'- AAT GAA TTA GGG GGA GGT GTG - 3') [10].

*PCR condition:* Reaction was performed in total reaction volume 25 µl of following composition: 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, 200 µM DTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 2.5 U Taq purple DNA polymerase, 10 pM primer and 25 ng template DNA. Altogether 35 PCR cycles run under the following condition: 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing (according the primer\*), 30 s elongation at 72°C, initial denaturation for 3 minutes at 94°C and final elongation for 5 minutes at 72°C. PCR products were visualized by ethidium bromide after the electrophoresis in a 3% Synergel/agarose gel in TBE buffer.

Primer pair	Annealing temperature (*)
STM1102	55°C
STM2005	54°C
STM3012	57°C
STM1106	57°C
STWIN12G	54°C
STM3015	57°C

*PCR-ISSR analyses.* For PCR-ISSR five primers were selected: P1 ((AC)<sub>8</sub>G: 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CG - 3'), P2 ((AG)<sub>8</sub>YT: AGA GAG AGA GAG AGA GYT), P3 ((GA)<sub>8</sub>YC: 5'- GAG AGA GAG AGA GAG AYC - 3'), P4 ((AC)<sub>8</sub>YG: 5'- ACA CAC ACA CAC ACA CYG - 3') (Y = C or T) [24] and B1 ((CA)<sub>6</sub>GT: 5'- CAC ACA CAC ACA GT - 3') [2].

*PCR condition:* Reaction volume was 25 µl, PCR was performed in 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, 200 µM DTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 2.5 U Taq purple DNA polymerase, 10 pM primer and 25 ng template DNA. Altogether 40 PCR cycles run over under the following condition: 60 s denaturation at 94°C, 60 s annealing at 55°C, 2 min elongation at 72°C, initial denaturation 2 minutes at 94°C and final elongation 7 minutes at 72°C. PCR products were visualized by ethidium bromide after the electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE buffer.

## RESULTS AND DISCUSSION

Microsatellite fingerprint patterns were transformed into a binary character matrix with 1 for presence or 0 for absence of a band at a particular position in a lane. After removing monomorphic bands, genetic distance matrices were generated using Gower General Similarity metrics and Cluster analysis (UPGMA – Unweighted Pair Group Method Averages) and PCO (Principal Coordinates Analysis) were performed. These statistical analyses were calculated using MVSP (Kovach Comp.Serv.) and STATISTICA 6.0 software package (Statsoft).

*SSRs analyses.* Polymorphism of SSR markers was observed for 20 selected varieties after amplification with six primer pairs. Statistical evaluation appears from matrix of presence polymorphic bands. There were evaluated 15 from 17 possible positions of bands. Microsatellite analysis allows to distinguish and identify 18 from total set of 20 varieties (Colette (2) and Impala (3) can not be distinguished) (Fig.1, Fig.2, Fig.4). Analogous results were recorded by other authors, e.g. Schneider and Douches [26] unambiguously distinguished 24 from 40 potato varieties by the usage of 6 SSR primer pairs. McGregor *et al.* [21] reliably identified 20 from 39 potato varieties by the usage of 5 SSR primer pairs.

*ISSRs analyses.* Polymorphism of ISSR markers (Inter Simple Sequence Repeats) was observed for 20 selected varieties after amplification with five primers. Statistical evaluation appears from matrix of presence polymorphic bands. There were evaluated all 216 possible positions of bands. Using of this method permits discrimination of each variety. The similarity between varieties was 65 – 80%. But we gather that this method is not utilizable, because we observed the variability within of variety (Fig.3). Although Prevost a Wilkinson [24] published the results where they staunchly determined all 34 potato varieties by usage of four ISSR primers and McGregor *et al.* [21] reliably identified all 39 potato varieties by usage of six ISSR primers we cannot recommend this method for variety identification not due to its resolving power but due to low stability and repeatability of ISSR technique.

## CONCLUSION

We obtained pattern of six SSR and five ISSR markers for the set of twenty selected varieties registered and cultivated in the Czech Republic in the year 2007. Recorded polymorphism was appraised and the varieties were separated to the categories by the fingerprint data. The method of SSR analysis is suitable for evaluation of variability and for the purposes of variety identification. On the other hand ISSR method conveys plentiful polymorphism but the disadvantage is a polymorphism within variety and we observed also the instability of the pattern depending on the age of DNA, likewise RAPD analyses [4].

For outright identification of whole range of potato varieties cultivated in the Czech Republic we recommend to use the set of molecular and morphological markers in accordance with Ghislain *et al.* [10] and Bežo *et al.* [2].

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants NAZV 1B44011, GACR 521/08/H042 and MSM 6007665806.

#### REFERENCES

- [1] Albani M.C., Wilkinson M.J., Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breed.* (1998) 117:573-575.
- [2] Bežo M., Hrubíková K., Štefanová V., Žiarovská J., Bežo M. ml, Candráková A., Plant germplasm evaluation retrotransposons and microsatellites. *Biotechnology 2006*, Scientific Pedagogical Publishing, České Budějovice, p.123.
- [3] Boyko E., Kalendar R., Korzun V., Korol A., Schulman A.H., Gills B.S., A high-density cytogenic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defence related genes: insight into cereal chromosome structure and function. *Plant Mol. Biol.* (2002) 48:767-790.
- [4] Chakrabarti S.K., Pattanayak D., Sarmat D., Chimote V.P., Naik P.S., Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biol. Plantarum* (2006) 50(4):531-536.
- [5] Demeke T., Kawchuk L.M., Lynch D.R., Identification of potato cultivars and clonal variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Am. Pot. J.* (1993) 70:561-569.
- [6] Desborough S., Peloquin S.J., Potato variety identification by use of electrophoretic parents of tuber proteins and enzymes. *Am. Pot. J.* (1968) 45:220-229.
- [7] Ellis T.H.N., Turner L., Hellens R.P., Lee D., Harker C.L., Enard C., Domoney C., Davies D.R., Linkage maps in Pea. *Genetics* (1998) 130:649-663.
- [8] Flavell A.J., Knox M.R., Pearce S.R., Ellis T.H.N., Retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* (1998) 16(5):643-650.
- [9] Gebhardt C., Blomendahl C., Schachtchabel U., Debener T., Salamini F., Ritter F., Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) with RFLP fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* (1989) 78: 16-22.
- [10] Ghislain M., Spooner D.M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Vásquez C., Waugh R., Bonierbale M., Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* (2004) 108:881-890.
- [11] Görg R., Schachtschabel U., Ritter E., Salamini F., Gebhardt C., Discrimination among 136 tetraploid potato variety by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Sci.* (1992) 32:815-819.
- [12] Gribbon B.M., Pearce S.R., Kalendar R., Schulman A.H., Paulin L., Jack P., Kumar A., Flavell A.J., Phylogeny and transpositional activity of *Ty1-copia* group retrotransposons in cereal genomes. *Mol. Gen. Genet.* (1999) 261:883-891.
- [13] Hamester W., Hils U., (eds) *World Catalogue of Potato Varieties*. Que Pub, Indianapolis, 2003.

- [14] Hosaka K., Mori M., Ogawa K., Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. *Am. Pot. J.* (1994) 71: 535-546.
- [15] Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A., IRAP and REMAP: two new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* (1999) 98:704-711.
- [16] Karp A., Seberg O., Buiatti M., Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* (1996) 78:143-149.
- [17] Kawchuk L.M., Lunch D.R., Thomas J., Penner B., Sillito D., Kulcsar F., Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Am. Pot. J.* (1996) 73:325-335.
- [18] Lee D., Reeves J.C., Cooke R.J., DNA profiling and plant variety registration: 2. Restriction fragment length polymorphisms in varieties of oilseed rape. *Plant Varieties and Seeds* (1996) 9:181-190.
- [19] Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A.H., Application of *BAR1* retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Mol. Gen. Genet.* (2000) 264:325-334.
- [20] Mba C., Tohme J. (2005): Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. In: Elizabeth A. Zimmer and Eric Roalson (eds.): *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data. Part B, Methods Enzymol.* 395:177-201.
- [21] McGregor C.E., Lambert C.A., Greyling M.M., Louw J.H., Warnich L., A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* (2000)113: 135-144.
- [22] Milbourne D., Meyer R.C., Bradshaw J.E., Barid E., Bonar N., Provan J., Powell W., Waugh R., Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Mol. Breed.* (1997) 3: 127-136.
- [23] Poreddu A., Albertini E., Barcaccia G., Falcinelli M., Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two-way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor. Appl. Genet.* (2002) 104:273-280.
- [24] Prevost A., Wilkinson M.J., A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivar. *Theor. Appl. Genet.* (1999) 98:107-112.
- [25] Provan J., Powell W., Waugh R., Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* (1996) 92:1078-1084.
- [26] Schneider K., Douches D.S., Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *Am. Potato. J.* (1997) 74:149-160.
- [27] Sosinski B., Douches D.S., Using polymerase chain reaction based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivar. *Hort. Sci.* (1996) 31:130-133.
- [28] UPOV (2002): Draft test guidelines for potato document TG/23/6(PROJ.1). 31. Session, Rio de Janeiro, Brazil, September 23 to 27, 2002.

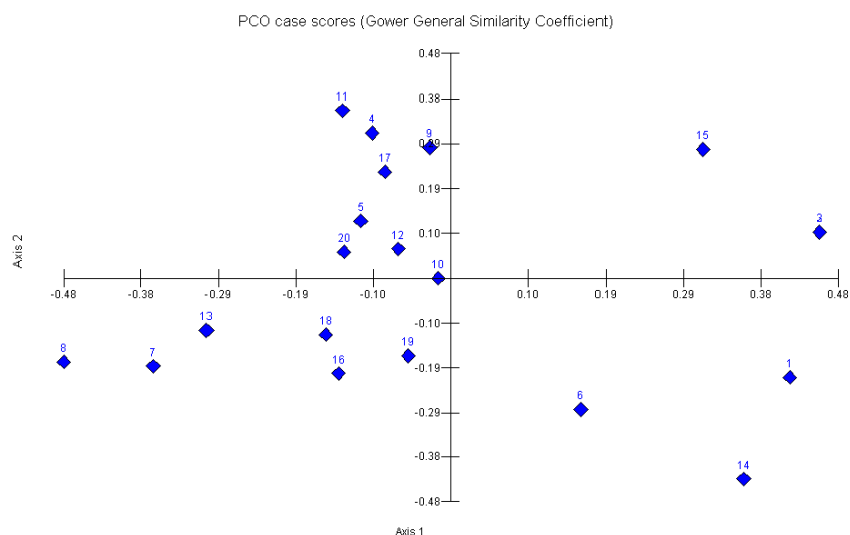
[29] Van der Voort J.K., Van Eck H.J., Draaistra J., van Zandvoort P.M., An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol. Breed.* (1998) 4:73-77.

[30] Van Treuren R., Magda A., Hoekstra R., van Hintum Th.J.L., Genetic and economic aspects of marker-assisted reduction of redundancy from a wild potato germplasm collection. *Genet. Res. Crop Ev.* (2004) 51:277-290.

[31] Vicent C.M., Kalendar R., Schulman A.H., Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Res.* (2001) 11:2041-2049.

[32] Vitte C., Lamy F., Ishii T., Brar D.S., Panaud O., Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa*, L.). *Mol. Gen. Genom.* (2004) 272:504-511.

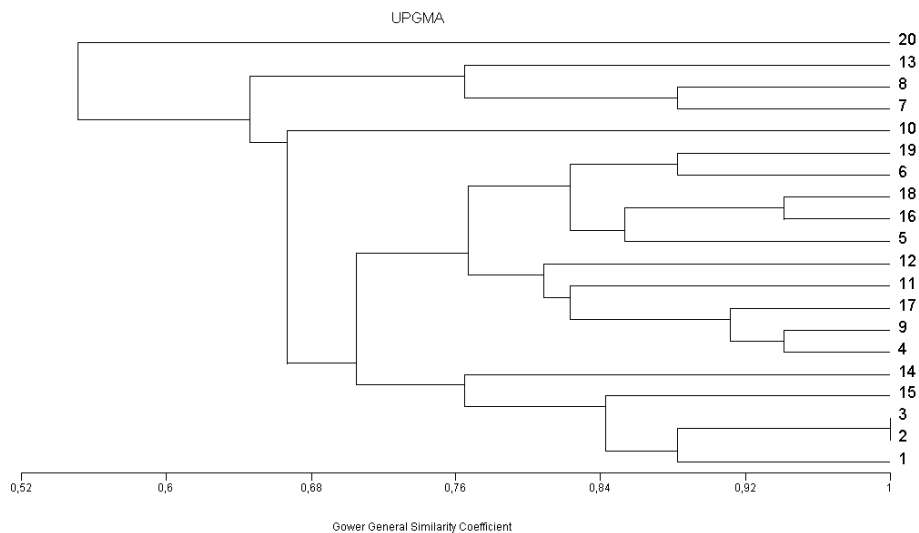
[33] Waugh R., Bonar N., Baier E., Thomas B., Graner A., Hayes P., Powell W., Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* (1997) 255(3):311-321.



**Fig.1.** Results of coordinate analyses – PCO analysis obtained by analyses of six SSR markers.

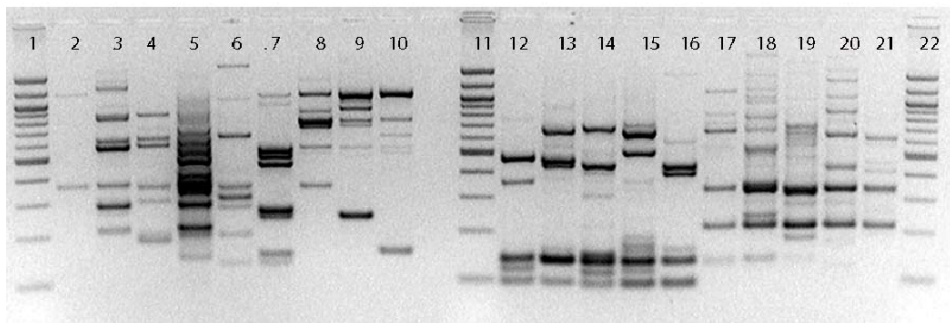
**Obr.1.** Výsledky ordinační analýzy – PCO získané analýzou šesti lokusů SSR.





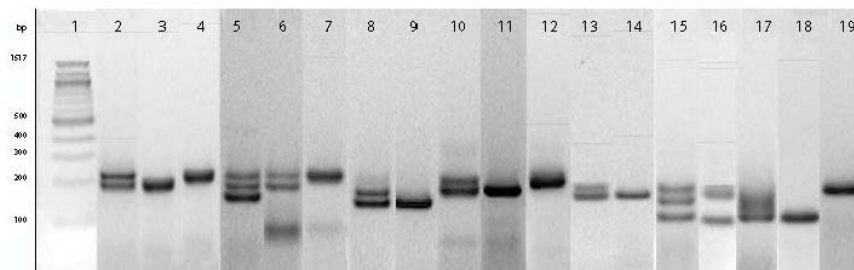
**Fig.2.** Dendrogram based on results of cluster analysis obtained by analyses of six SSR markers.

**Obr.2.** Dendrogram sestavený na základě výsledků klastrové analýzy získané analýzou 6 SSR lokusů.



**Fig.3.** Example of electrophoreogram - 2% agarose gel. ISSR analysis. Variety Adora tubers A-D, 2-5 primer P1, 6-9 primer P2, 10, and 12,13 primer P3, 14-17 primer P4 and 18-21 primer B1, 1,11 and 22 DNA ladder marker 100bp.

**Obr.3.** Ukázka elektroforeogramu - 2% agarosový gel. ISSR analýza. Odrůda Adora hlízy A-D, 2-5 primer P1, 6-9 primer P2, 10, a 12,13 primer P3, 14-17 primer P4 a 18-21 primer B1, 1,11 a 22 DNA hmotnostní marker 100bp.



**Fig.4.** Example of electrophoreogram - 3% Synergel/agarose gel. SSR analysis. 1 DNA ladder marker 100bp, 2 – 4 primers STM1102, 2 (varieties 1, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 18, 19), 3 (varieties 2, 3, 4, 5, 9, 11, 15, 17), 4 (varieties 14, 20), 5 – 7 primers STM2005, 5 (variety 13), 6 (varieties 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19), 7 (varieties 6, 11, 12, 14, 15, 16, 20), 8 and 9 primers STM3012, 8 (varieties 1, 2, 3, 4, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 20), 9 (varieties 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 18, 19), 10-12 primers STM1106, 10 (variety 11), 11 (varieties 7, 8, 13, 20), 12 (varieties 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19), 13 and 14 primers STWIN12G, 13 (varieties 1, 14, 16, 17, 20), 14 (varieties 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19), 15 – 19 primers STM3015, 15 (varieties 1, 2, 3, 14, 15), 16 (varieties 5, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 18), 17 (variety 6), 18 (varieties 4, 8, 10, 17, 19), 19 (variety 20).

**Obr.4.** Ukázka elektroforeogramu - 3% Synergel/agarosový gel. SSR analýza. 1 DNA hmotnostní marker 100bp, 2 – 4 primery STM1102, 2 (odrůdy 1, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 18, 19), 3 (odrůdy 2, 3, 4, 5, 9, 11, 15, 17), 4 (odrůdy 14, 20), 5 – 7 primery STM2005, 5 (odrůda 13), 6 (odrůdy 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19), 7 (odrůdy 6, 11, 12, 14, 15, 16, 20), 8 a 9 primery STM3012, 8 (odrůdy 1, 2, 3, 4, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 20), 9 (odrůdy 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 18, 19), 10-12 primery STM1106, 10 (odrůda 11), 11 (odrůdy 7, 8, 13, 20), 12 (odrůdy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19), 13 a 14 primery STWIN12G, 13 (odrůdy 1, 14, 16, 17, 20), 14 (odrůdy 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19), 15 – 19 primery STM3015, 15 (odrůdy 1, 2, 3, 14, 15), 16 (odrůdy 5, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 18), 17 (odrůda 6), 18 (odrůdy 4, 8, 10, 17, 19), 19 (odrůda 20).

**7.3. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses**

**Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V.**

## Potato Variety Identification by Molecular Markers Based on Retrotransposon Analyses

ALENA NOVÁKOVÁ, KATEŘINA ŠIMÁČKOVÁ, JAN BÁRTA and VLADISLAV ČURN

*Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia,  
České Budějovice, Czech Republic*

**Abstract:** We analyzed a set of twenty most grown potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties listed in the Czech Variety List using the PCR-IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) method in order to distinguish fast and unambiguously the varieties. In total, 62 polymorphic alleles were amplified using the three primers P-Tst-1, P-Tst-3 and P-Tst-6. The recorded pattern of markers was stable and reproducible. The analyses were repeated three times and identical results were always obtained. The level of polymorphism varied from 11% to 79% depending on the respective primer. All analysed varieties could be reliably distinguished after multivariate statistics have been applied to the data obtained by the PCO and UPGMA analyses. The best resolution of individual varieties was obtained if all three primers were evaluated as a complex. The use of retrotransposon-based markers appears to be suitable for the differentiation of large sets of potato samples and should be an eligible complement to other molecular markers used in potato variety identification such as Simple Sequence Repeats (SSR) and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP).

**Keywords:** molecular markers; PCR-IRAP; *Solanum tuberosum*; variety identification

The identification of varieties of agricultural and horticultural crops is important during their breeding and registration process, seed production, trade and inspection. Currently, there are more than 4200 different potato varieties which are cultivated in over 100 countries worldwide (HAMESTER & HILS 2003). In 2007, there were 178 potato varieties listed in the official Czech Variety List (ČERMÁK 2007). The traditional approach to variety identification is the observation and recording of morphological characters or descriptors. This approach is precise but time-consuming. Guidelines for potatoes, for instance, consist of 50 characters, out of which 12 deal with sprouting, along with a series of characters such as plant height, leaf size and various features of flowers and tubers. Such an approach is still used for official testing of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) as required for the grant of Plant Breeders Rights

and official variety registration. However, it is less suitable when results are required rapidly, e.g. for the variety confirmation based on tuber material identification. Furthermore, morphological characters are often multigenic, not available at all growth stages and influenced by environment, making it difficult to assess them quickly and objectively, and requiring repeated observations. This traditional or phenotypic approach is not effective for large collections, especially for identification at the level of tubers (COOKE & REEVES 1998).

Molecular markers may serve as a modern and suitable approach to variety identification. This approach can also be more rapid and cost-effective. Different molecular marker techniques were used in potato population genetics and variety identification (GEBHARDT *et al.* 1994), phylogenetic and biodiversity studies (KARDOLUS *et al.* 1997), analysis of recombination frequencies between

genotypes (WILLIAMS *et al.* 1993), identification of genes for important agricultural traits (GEBHARDT *et al.* 1994) and marker assisted selection (HAMALAINEN *et al.* 1997). Molecular markers used in potatoes include Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (DEMEKE *et al.* 1993; KARP *et al.* 1996; LEE *et al.* 1996; SOSINSKI & DOUCHES 1996; MCGREGOR *et al.* 2000), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (DEMEKE *et al.* 1993; HOSAKA *et al.* 1994; PROVAN *et al.* 1996; MILBOURNE *et al.* 1997; VAN DER VOORT *et al.* 1998; MCGREGOR *et al.* 2000; VAN TREUREN *et al.* 2004), microsatellites – analyses of Simple Sequence Repeats (SSR) (KAWCHUK *et al.* 1996; PROVAN *et al.* 1996; MCGREGOR *et al.* 2000; GHISLAIN *et al.* 2004) or Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs) (ALBANI & WILKINSON 1998; PREVOST & WILKINSON 1999). Notwithstanding the prospect and advantages of the application of molecular markers in variety identification, the only legal DUS testing system is based on morphology and traditional phenotypic evaluation. The molecular approach must be further examined and stabilised, because variety identification is one of the most controversial and problematic issues of molecular marker application in breeding and official variety testing (ČURN & ŽALUDOVÁ 2007).

Retrotransposon-based markers are a novel group of molecular markers used for genotype description and identification, and they are also useful in potato breeding. Mobile genetic elements, retrotransposons, generally show widespread chromosomal dispersion, variable copy number and random distribution in the genome (KUMAR *et al.* 1997; KALENDAR *et al.* 1999). The dispersion (KATSOTIS *et al.* 1996; SUONIEMI *et al.* 1996), ubiquity (FLAVELL *et al.* 1992; VOYTAS *et al.* 1992) and prevalence (PEARCE *et al.* 1996, 1997) of retrotransposon-like elements in plant genomes can be exploited for DNA-fingerprinting. The application of IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) and REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) has been demonstrated to provide suitable polymorphic markers for variety identification or breeding purposes (KALENDAR *et al.* 1999; VICIENT *et al.* 2001), mapping of resistance genes in cereals (MANNINEN *et al.* 2000; BOYKO *et al.* 2002) and gene diversity detection in potatoes (LIGHTBOURN *et al.* 2007, SPOONER *et al.* 2007). For all above-mentioned applications, specific species-derived retroelement LTR sequences had to be isolated,

which fact represents a certain limitation of their use. Locus-specific RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) approach was developed by FLAVELL *et al.* (1998) for the high throughput marker analysis of *Pisum* genotypes. Retrotransposons consist of two subclasses of elements, long-terminal repeat (LTR) and non-LTR retrotransposons, and the former are further subdivided into two groups – Ty1/*copia* type and Ty3/*gypsy* type (XIONG & EICKBUSCH 1990). Ty1/*copia* LTR retrotransposons contain open reading frames (ORFs) corresponding to retroviral *gag* and *pol* genes and have functional domains in *pol* ordered protease (PR), integrase (in), RNA-dependent DNA polymerase (RT) and RNase H (RH). In this context, LTR-retrotransposons possess unique properties that make them appropriate for investigating the relationship between closely related species and populations (KUMAR & HIROCHIKA 2001). LTR-retrotransposons appear to evolve at significantly higher rates than conventional nuclear loci (PURUGGANAN & WESSLER 1995). The genomic organisation and diversity of the Ty1-*copia* group retrotransposon have been investigated in several crop plants and their relatives from both dicotyledonous and monocotyledonous families, including *Solanum tuberosum*, *Vicia faba*, *Vicia melanops*, *Vicia sativa*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* and *Allium cepa* (KUMAR *et al.* 1997). Retrotransposon-based techniques were mainly used for genetic-diversity studies (KALENDAR *et al.* 1999; FLAVELL *et al.* 1998; PORCEDDU *et al.* 2002; VITTE *et al.* 2004).

Alternatively, retrotransposons can be used in an AFLP-type reaction (Vos *et al.* 1995), called Sequence-Specific Amplified Polymorphism SSAP (WAUGH *et al.* 1997). In the SSAP technique, selective bases added to primers reduced the complexity of the amplified DNA, depending on the copy number of retrotransposon targets.

The study was aimed to answer following questions:

(1) Are retrotransposon-based markers suitable markers for the differentiation of large sets of potato samples and do they provide a reproducible and stable pattern of markers?

(2) Are retrotransposon-based markers easy to use, without special requirements for DNA quality/quantity and are standard DNA isolation procedures sufficient?

(3) Are retrotransposon-based markers suitable to distinguish individual potato varieties and are

retrotransposon-based markers useful complements to SSR or AFLP markers?

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** The evaluated set of the twenty most grown potato varieties officially registered in the Czech Republic is listed in Table 1, together with their origin and EVIGEZ (Plant Genetic Resources Documentation in the Czech Republic) reference number. The plant material (tubers) was kindly supplied by the Czech Plant Variety Office (workplace Lípa u Havlíčkova Brodu). DNA was isolated from individual tubers, four samples from each variety, and all analyses were repeated three times to confirm the stability and reproducibility of analysed markers. DNA was extracted from a lyophilized tuber tissue by the modified CTABDNA extraction method (ROGERS & BENDICH 1994) and polyvinylpyrrolidone (PVP-40000-360000, SIGMA,

St. Louis, USA) was added to the extraction buffer (50 mg per sample).

**IRAP analysis.** For IRAP analyses, three primers P-Tst-1 (5-ATG ACT AAA TCT GCC TAC TCA TTC AAC A-3), P-Tst-3 (5-ACT AAA AAT CTG CCT ACT CAT TCA ACA CTC-3) and P-Tst-6 (5-ACT AAA TCT GCC TAC TCA TTC AAC ACT C-3) previously used by BEŽO *et al.* (2006) and HRUBÍKOVÁ *et al.* (2006) were tested.

**PCR conditions for analyses of all retrotransposon-based markers.** The reaction was performed in a total reaction volume of 25 µl of the following composition: 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase (TaKaRa, Shiga, Japan), 10pM primer (GIBCO, Carlsbad, USA) and 40 ng template DNA. After initial denaturation for 3 min at 94°C, thirty-five PCR cycles were performed, with 60 s of denaturation at 94°C, 60 s of annealing at 55°C, and 120 s of polymerisation at 72°C, followed by

Table 1. List of analysed potato varieties

Variety name	Number in gel or plots	Reference numbers of LVIGEZ databases	Origin (breeder)
Adéla	1	07S0101965	Selekta Pacov, a.s., Pacov, CZ
Adora	2	07S0101678	HZPC Holland B.V., Joure, NL
Agria	3	07S0101354	AGRICO B.A., Emmeloord, NL
Asterix	4	07S0101590	HZPC Holland B.V., Joure, NL
Colette	5	07S0101780	Kartoffelzucht Böhm KG Lüneburg, D
Dali	6	07S0101721	Kweekbedrijf Ropta-ZPC, Metslawier-St. Annaprochie, NL
Desirée	7	07S0100243	HZPC Holland B.V., Joure, NL
Dítta	8	07S0101601	Niederösterreichische Saatbaugenossenschaft reg. GmbH, Windigsteig, A
Filea	9	07S0101781	Nordkartoffel-Zuchtgesellschaft mbH, Lüneburg, D
Impala	10	07S0101538	AGRICO B.A., Emmeloord, NI.
Karin	11	07S0101171	Sativa Keřkov, a.s., Přibyslav, CZ
Laura	12	07S0101917	EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH, Lüneburg, D
Magda	13	07S0101979	Vesa Velhartice, a.s., Kolinec, CZ
Marabel	14	07S0101730	Kartoffelzucht Böhm KG Lüneburg, D
Rosara	15	07S0101670	SAKA-RAGIS Pflanzenzucht GbR Hamburg, D
Samantana	16	07S0101xxx	Selekta Pacov, a.s., Pacov, CZ
Santana	17	07S0102015	Handelmaatschappij VAN RIJN B.V., Poeldijk, NL
Secura	18	07S0101434	SAKA-RAGIS Pflanzenzucht GbR, Hamburg, D
Solara	19	07S0101583	Nordkartoffel-Zuchtgesellschaft mbH, Lüneburg, D
Velox	20	07S0101737	SAKA-RAGIS Pflanzenzucht GbR Hamburg, D

final elongation for 5 min at 72°C. PCR products were visualised by ethidium bromide staining after electrophoresis on 2% agarose gel (INVITROGEN, Carlsbad, USA) in 1 × TBE buffers, examples of the pattern are summarized in Figure 2. Bands were recorded using Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System (EPSON Inc., Long Beach, USA).

**Data analysis.** Molecular data files were analysed by the UltraQuant 6.0 software (UltraLum, Claremont, USA) with manual correction. Fingerprint patterns were transformed into a binary character matrix with 1 for the presence or 0 for the absence of a band at a particular position in a lane. After removing monomorphic bands, genetic distance matrices were generated using NEI and LI (1979) and Gower's General Similarity matrix and cluster analysis (UPGMA – Unweighted Pair Group Method Averages) and PCO (Principal Coordinates Analysis) were performed. These statistical analyses were calculated using the MVSP (Kovach Comp. Serv., Pentraeth, UK) and STATISTICA 6.0 software package (Statsoft, Tulsa, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The 20 potato varieties were analysed using 3 IRAP primers. Number of amplified bands, number of polymorphic bands per primer and variety, primer differentiation ability indices and similarity indices are given in Tables 2–3. The highest number of amplified and polymorphic bands was obtained using primer P-Tst-6. The highest number of bands (15) was amplified in the variety Velox with primer P-Tst-3. The average number of amplified bands was 10. Primer P-Tst-6 revealed the highest number of polymorphic bands and also analysis using this primer was the most informative for cluster analysis and PCO analyses, all cluster and PCO analyses are summarized in the Figure 3.

In all twenty approved varieties all analyses were performed on four individual tubers and

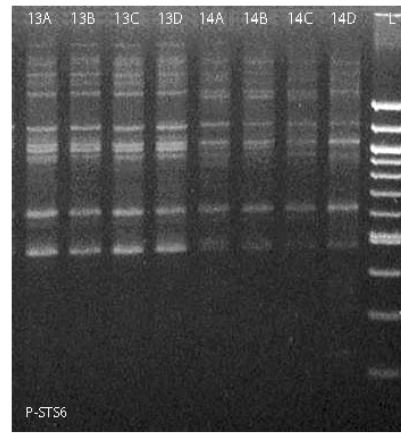


Figure 1. Stability of analysed retrotransposon-based markers; results of analysis with P-Tst-6 primer, 2% agarose gel, varieties 13 and 14 (replicates A-D represent individual tubers), L – 100 bp

the analyses were repeated three times. The aim of the study was to verify the assumed stability of retrotransposon-based markers and reproducibility of these markers. The number of amplified bands and the character of banding patterns were stable and identical in all analyses of particular genotypes as shown in Figure 1. On the basis of these results, we can positively answer the posed questions and suggest that IRAP technique generates stable and reproducible patterns of markers in potato. The stability of IRAP markers is conditioned and predetermined by optimal DNA quantity and quality. The generation of scorable and reproducible pattern of these markers seems to be strongly influenced by the quality of DNA template and by the DNA isolation method employed. The yield and purity of isolated DNA were a crucial problem. DNA was isolated from a lyophilised tuber tissue. The isolation of DNA from potato tuber juice or

Table 2. The number of amplified polymorphic bands in a set of 20 potato varieties

Primer	Variety																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Number of amplified polymorphic bands for particular primers																			
P-Tst-1	9	10	11	12	7	5	11	9	10	10	9	4	7	13	5	6	15	13	8	12
P-Tst-3	8	14	13	11	7	9	12	5	9	14	8	8	13	12	6	11	13	10	11	15
P-Tst-6	10	12	10	10	6	11	10	5	9	8	13	8	8	10	6	8	9	8	7	9

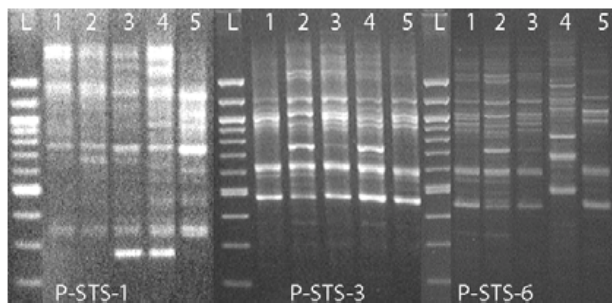


Figure 2. An example of electrophoregram – 2% agarose gel, varieties 1–5, L – 100bp, primers P-Tst-1, P-Tst-3, P-Tst-6

fresh tubers did not provide a sufficient amount (concentration) of DNA. Isolation procedures based on modified ROGERS and BENDICH (1994) CTAB protocol resulted in an incomparably higher yield of sufficiently pure DNA. DNA isolation using Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK, Hayward, USA) afford maximum 25 ng DNA. By using of CTAB protocol we obtained at least 40 ng of DNA per analysed sample. An addition of PVP (40 000–360 000) to lysis buffer and replication of "chloroform steps" during DNA isolation further improved the quality of DNA template and did not negatively influence the cost and speed of DNA isolation. These results are in correspondence with findings published by LI *et al.* (2007).

In primer P-Tst-1, altogether 19 polymorphic bands were amplified, in primer P-Tst-3 20 bands and in primer P-Tst-6 23 bands were amplified (Table 3, Figure 2). All analysed samples were evaluated in two ways – based on particular single primer used in IRAP analysis and based on the combination of all three primers. Modern approaches of the digital image analysis of primary electrophoretic data combined with statistical evaluation were used. The position of particular bands was digitized, and binary data of the presence/absence of particular bands were assembled. NEI and LI (1979) and Gower's General Similar-

ity Coefficients were calculated for the analysed pairs of varieties, both similarity indices provided comparable results, but ordinary analyses are feasible to be calculated only with GGSC (according to analytical software MVSP). NEI and LI similarity indices were in the range of 0%–86% in primer P-Tst-1, 13%–87% in P-Tst-3 and 11%–89% in P-Tst-6. The smallest recorded distance was between the varieties Asterix and Impala (11% in primer P-Tst-6), the largest recorded distance was between varieties Adora and Ditta, Adora and Impala, Adora and Magda (100% in primer P-Tst-1). Using this method allows the discrimination of the whole set of 20 varieties, the resolution power of analysed retrotransposon-based markers was higher than in microsatellites (NOVÁKOVÁ *et al.* 2007) and differences between varieties allowed the reliable differentiation of all individual varieties. Grouping in all three individual primers and also in the complex analysis was slightly different, so there was no grouping pattern according to the recorded variety lineages. The large genetic distance of analysed varieties should be one of the explanations of this situation and the pattern of these results could be changed after the large-scale analysis of an extensive set of varieties. PCO analysis also gave similar results and no massive grouping of varieties was recorded, and analysed

Table 3. The number of amplified and polymorphic bands per particular primer in a set of 20 potato varieties

Primer	Total number of amplified bands	Number of amplified polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands
P-Tst-1	21	19	90
P-Tst-3	22	20	90
P-Tst-6	23	23	100
P-Tst-1 + P-Tst-3 + P-Tst-6	66	62	94



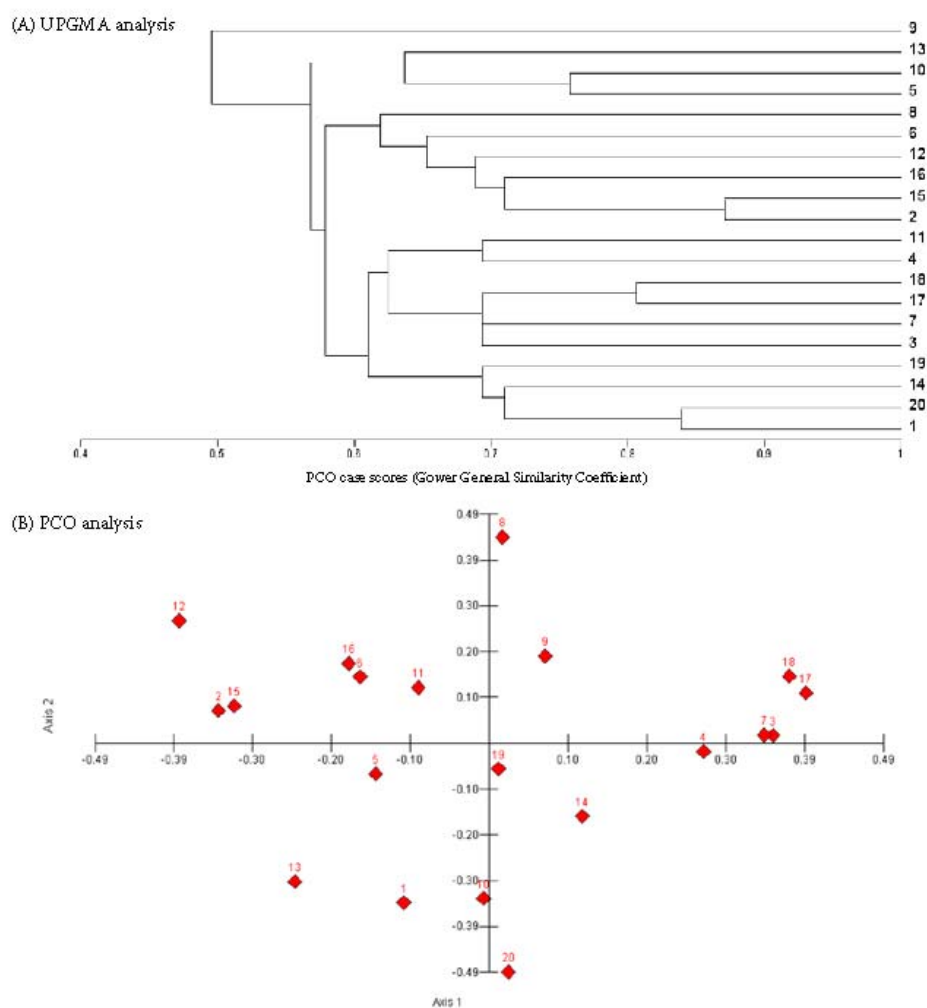


Figure 3. Results of cluster (UPGMA) and coordinate analysis (PCO analysis) obtained by IRAP marker analyses

varieties were also dispersed evenly across the ordinary diagram.

Comparable results were published by BEŽO *et al.* (2006) in studies with a wide set of Slovak potato varieties. ŽIAROVSKÁ (2007) also reported the suitability of retrotransposon-based markers for discrimination of potato varieties on the basis of IRAP, REMAP and microsatellite markers. HRUBÍKOVÁ *et al.* (2006) published similar results for retrotransposon-based markers. In that study,

they analysed 26 potato genotypes and IRAP gave 52 fragments with 80% polymorphism. SMÝKAL (2006) using IRAP, RBIP and SSRs markers, unequivocally identified 15 out of 33 pea varieties and the others made 9 cluster groups with 2–3 members in each. ANTONIUS-KLEMOLA *et al.* (2006) used a retrotransposon-based approach to the identification of apple varieties. They used nine primers for IRAP analyses when one primer produced from 6 to 15 informative fragments. Further, they found

that most IRAP bands from apple samples were not shared with Japanese quince. By combination of the set of nine IRAP primers, all standard apple varieties had unique profiles, whereas all sport mutations of a single variety gave identical patterns to their mother cultivars. In addition, they obtained the identical results from analyses carried out in two geographically distant laboratories. NAIR *et al.* (2005) used IRAP markers for the genome classification of banana varieties from South India. They observed that the genomic DNA of the 36 varieties showed multiple polymorphic bands with *gypsi*-IRAP primer. A specific band of about 350 bp was observed in all the varieties with the B genome, moreover, they found that the intensity of this band increased in varieties with two B genomes.

Compared to RAPD or ISSR techniques (ZIETKIEWICZ *et al.* 1994; PATTANAYAK *et al.* 2002; CHAKRABARTI *et al.* 2006) widely used in potato genetic resources evaluation, description and variety identification by retrotransposon-based markers are stable, reproducible and provide a similar or even higher level of polymorphism. Because of low polymorphism, a larger set of microsatellite markers must be analyzed for the precise description and discrimination of particular genotypes as was reported by KAWCHUK *et al.* (1996), as well as by ASHKENAZI *et al.* (2001) and GHISLAIN *et al.* (2004). AFLP, a modern technique widely used in plant genotyping, has an application also in the field of potato variety identification and germplasm description (VAN TREUREN *et al.* 2004). Compared to retrotransposon-based markers, this approach is much more difficult (amount and purity of template DNA, complexity and cost of analyses, demands on a separation technique) and thus retrotransposon-based markers are a suitable marker system utilizable in potato variety identification.

New techniques based on DNA profiling provide novel approaches to variety identification which offer advantages over traditional morphological comparisons. Retrotransposon-based markers are a novel group of markers not yet widely used in potato breeding and potato variety identification. In this study we have analyzed a set of the twenty most grown potato varieties officially registered in the Czech Republic using the IRAP method. Altogether 62 polymorphic alleles (bands) were amplified using three primers and all three primers provided sufficient resolution power and allow

the discrimination of all analysed varieties. The best resolution of the analysed set of varieties was achieved when all markers generated by all three primers were evaluated in a complex. IRAP markers were stable and reproducible during all analyses and no instability between tubers (Figure 1) and replicated analyses (data not shown) was recorded. This approach, utilization of retrotransposon-based markers, is suitable for the differentiation of large sets of potato samples and has also specific requirements (quality of DNA) and should be an eligible complement to other molecular markers used in potato variety identification (SSRs, AFLPs).

**Acknowledgements.** This study was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. 1B44011, by Czech Science Foundation, Grant No. 521/08/H042 and by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Project No. MSM 6007665806.

#### References

- ALBANI M.C., WILKINSON M.J. (1998): Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding*, **117**: 573–575.
- ANTONIUS-KLIMOLA K., KALENDAR R., SCHULMAN A.H. (2006): TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 999–1008.
- ASHKENAZI V., CHANI E., LAVI U., LEVY D., HILLER J., VEILLEUX E. (2001): Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, **44**: 50–62.
- BEŽO M., HRUBÍKOVÁ K., ŠTEFANOVÁ V., ŽIAROVSKÁ J., BEŽO M. JR., CANDRÁKOVÁ A. (2006): Plant Germplasm Evaluation using Retrotransposons and Microsatellites. *Biotechnology 2006*. Scientific Pedagogical Publishing, České Budějovice, 33–35.
- BOYKO E., KALENDAR R., KORZUN V., KOROL A., SCHULMAN A.H., GILLS B.S. (2002): A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defence related genes: insight into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology*, **48**: 767–790.
- CHAKRABARTI S.K., PATTANAYAK D., SARMAT D., CHIMOTE V.P., NAIK P.S. (2006): Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biologia Plantarum*, **50**: 531–536.
- COOKE R.J., REEVES J.C. (1998): New approaches to potato variety identification. *Potato Research*, **42**: 529–539.

- ČERMÁK V. (2007): Review of Potato Varieties 2007. The Czech Variety Office, Brno. Available at [http://www.ukzuz.cz/Uploads/7435-7-PO\\_brambory07pdf.aspx](http://www.ukzuz.cz/Uploads/7435-7-PO_brambory07pdf.aspx). (in Czech)
- ČURN V., ŽALUDOVÁ J. (2007): Fingerprinting of oilseed rape cultivars. In: GUPTA S. (ed.): Rapeseed Breeding. Advances in Botanical Research, Volume 45, Elsevier Publ., San Diego, 155–179.
- DEMEKE T., KAWCHUK L.M., LYNCH D.R. (1993): Identification of potato cultivars and clonal variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. American Potato Journal, **70**: 561–569.
- FLAVELL A.J., DUNABAR E., ANDERSON R., PEARCE S.R., HARTLEY R., KUMAR A. (1992): *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. Nucleic Acids Research, **20**: 3639–3644.
- FLAVELL A.J., KNOX M.R., PEARCE S.R., ELLIS T.H.N. (1998): Retrotransposon-based insertion polymorphism (REIP) for high throughput marker analysis. The Plant Journal, **16**: 643–650.
- GEBGHARDT C., BALLVORA A., WALKENMEIER B., OBERHAGEMANN P., SCHILLER K. (1994): Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding, **13**: 93–102.
- GHISLAIN M., SPOONER D.M., RODRÍGUEZ F., VILLAMÓN E., NÚÑEZ J., VÁSQUEZ C., WAUGH R., BONIERBALE M. (2004): Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. Theoretical and Applied Genetics, **108**: 881–890.
- HAMALAINEN J.H., WATANABE K.N., VALKONEN J.P.T., ARIHARA A., PLAISTED R.L., PEHU E., MILLER L., SLAK S.A. (1997): Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. Theoretical and Applied Genetics, **94**: 192–197.
- HAMESTER W., HILS U. (eds) (2003): World Catalogue of Potato Varieties. Que Pub, Indianapolis.
- HOSAKA K., MORI M., OGAWA K. (1994): Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. American Potato Journal, **71**: 535–546.
- HŘUBÍKOVÁ K., BEŽO M., ŽIAROVSKÁ J., CANDRÁKOVÁ A. (2006): Retrotransposons, their importance and exploitation for organism's genome mapping. Acta Fytotechnica et Zootechnica, Slova Universitas Agriculturae Nitriae, **9** (Extra Issue): 74–77.
- KALENDAR R., GROB T., REGINA M., SUONIEMI A., SCHULMAN A. (1999): IRAP and REMAP: two new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. Theoretical and Applied Genetics, **98**: 704–711.
- KARDOLUS J.P., VAN ECK B.J., VAN DEN BERG R.G. (1997): The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). Plant Systematics and Evolution, **210**: 87–103.
- KARP A., SEBERG O., BUIATTI M. (1996): Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Annals of Botany, **78**: 143–149.
- KATSIOTIS A., SCHMIDT T., HESLOP-HARRISON J.S. (1996): Chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposon sequences in the genus *Avena*. Genome, **39**: 410–417.
- KAWCHUK L.M., LUNCH D.R., THOMAS J., PENNER B., SILLITO D., KULCSAR F. (1996): Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. American Potato Journal, **73**: 325–335.
- KUMAR A., HIROCHIKA H. (2001): Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. Trends in Plant Sciences, **6**: 127–134.
- KUMAR A., PEARCE S.R., MCLEAN K., HARRISON G., HESLOP-HARRISON J.S., WAUGH R., FLAVELL A.J. (1997): The *Ty1-copia* group of retrotransposon in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers. Genetica, **100**: 205–217.
- LEE D., REEVES J.C., COOKE R.J. (1996): DNA profiling and plant variety registration: 2. Restriction fragment length polymorphisms in varieties of oilseed rape. Plant Varieties and Seeds, **9**: 181–190.
- LI J.T., YANG J., CHEN D.C., ZHANG X.L., TANG Z.S. (2007): An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. Genetics and Molecular Research, **6**: 1064–1071.
- LIGHTBOURN G.J., JELESKO J.G., VEILLEUX R.E. (2007): Retrotransposon-based markers from potato monoids used in somatic hybridization. Genome, **50**: 492–501.
- MANNINEN O., KALENDAR R., ROBINSON J., SCHULMAN A.H. (2000): Application of *BARE-1* retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. Molecular Genetics and Genomics, **264**: 325–334.
- MCGREGOR C.E., LAMBERT C.A., GREYLING M.M., LOUW J.H., WARNICH L. (2000): A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica, **113**: 135–144.
- MILBOURNE D., MEYER R.C., BRADSHAW J.E., BARD E., BONAR N., PROVAN J., POWELL W., WAUGH R. (1997): Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. Molecular Breeding, **3**: 127–136.
- NAIR A.S., TEO C.H., SCHWARZACHER T., HARRISON P.H. (2005): Genome classification of banana cultivars

- from South India using IRAP markers. *Euphytica*, **144**: 285–290.
- NEI M., LI W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**: 5269–5273.
- NOVÁKOVÁ A., ŠIMÁČKOVÁ K., BÁRTA J., ČURN V. (2007): Potato variety identification by molecular markers. In: 6<sup>th</sup> Plant Genomics European Meeting, October 3–6, 2007, Tenerife.
- PATTANAYAK D., CHAKRABARTI S.K., NAIK P.S. (2002): Genetic diversity of late blight resistant and susceptible Indian potato cultivars revealed by RAPD markers. *Euphytica*, **128**: 183–189.
- PEARCE S.R., HARRISON G., LI D., HESLOP-HARRISON J.S., KUMAR A., FLAVELL A.J. (1996): The *Ty1-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Molecular Genetics and Genomics*, **250**: 305–315.
- PEARCE S.R., HARRISON G., LI D., HESLOP-HARRISON J.S., FLAVELL A.J., KUMAR A. (1997): Characterisation and genomic organization of the *Ty1-copia* group retrotransposons in rye (*Secale cereale*). *Genome*, **40**: 617–625.
- PORCEDDU A., ALBERTINI E., BARCACCIA G., FALCINELLI M. (2002): Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two-way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 273–280.
- PRIVOST A., WILKINSON M.J. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivar. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 107–112.
- PROVAN J., POWELL W., WAUGH R. (1996): Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*, **92**: 1078–1084.
- PURUGGANAN M.D., WESSLER S.R. (1995): Transposon signatures: species-specific molecular markers that utilize a class of multiple-copy nuclear DNA. *Molecular Ecology*, **4**: 265–269.
- ROGERS S.O., BENDICH A.J. (1994): Extraction of DNA from plant, fungal and algal tissues. In: GELVIN S.B., SCHILPEROORT R.A. (eds): *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1–8.
- SMÝKAL P. (2006): Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Journal of Applied Genetics*, **47**: 221–230.
- SOSINSKI B., DOUCHES D.S. (1996): Using polymerase chain reaction – based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivars. *HortScience*, **31**: 130–133.
- SPOONER D.M., NUNEZ J., TRUJILLO G. *et al.* (2007): Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: 19398–19403.
- SUONIEMI A., NARVANTO A., SCHULMAN A.H. (1996): The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Molecular Biology*, **31**: 295–306.
- VAN DER VOORT J.K., VAN ECK H.J., DRAAISTRA J., VAN ZANDVOORT P.M. (1998): An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Molecular Breeding*, **4**: 73–77.
- VAN TREUREN R., MAGDA A., HOEKSTRA R., VAN HINTUM TH.J.L. (2004): Genetic and economic aspects of marker-assisted reduction of redundancy from a wild potato germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **51**: 277–290.
- VICIENT C.M., KALENDAR R., SCHULMAN A.H. (2001): Envelope class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Research*, **11**: 2041–2049.
- VITTE C., LAMY F., ISHII T., BRAR D.S., PANAUD O. (2004): Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, **272**: 504–511.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REHANS M., VAN DE LEE T., HOMES M., FRUITERS A., POT J., PELLMAN J., KUIPER M., ZEBEAU M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407–4414.
- VOYTAS D.F., CUMMINGS M.P., KONIECZNY A., AUSUBEL T.M., RODEEMAL S.R. (1992): *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **89**: 7124–7128.
- WALBOT V. (1992): Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: 49–82.
- WAUGH R., BONAR N., BAIER E., THOMAS B., GRANER A., HAYES P., POWELL W. (1997): Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Molecular Genetics and Genomics*, **255**: 311–321.
- WILLIAMS C.E., WIELGUS S.M., HABERLACH G.T., GUENTHER C., KIM-LEE H., HEGELSON J.P. (1993): RFLP analysis of chromosomal segregation in progeny from an interspecific hexaploid somatic hybrid between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Genetics*, **135**: 167–173.

- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176–183.
- ŽIAROVSKÁ J. (2007): Evaluation of flax and potato gene pool on the level of DNA polymorphism. [Ph.D. Thesis.] SPU, Nitra. (in Slovak)

Received for publication March 17, 2008

Accepted after corrections March 3, 2009

---

*Corresponding author:*

Ing. ALENA NOVÁKOVÁ, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika  
tel: + 420 387 772 586, fax: + 420 387 772 584, e-mail: alena.n@seznam.cz

---

**7.4. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) / Methodology of DNA isolation and molecular markers analysis for description of genetic resources and identification of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.)**

**V. Čurn, A. Nováková, K. Šimáčková, B. Kubátová**



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta



BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM  
JU ZF ČESKÉ BUDĚJOVICE

## Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.)



Autoři: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Alena Nováková,  
Ing. Kateřina Šimáčková, Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.

České Budějovice, 2008

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta**

**Metodika izolace DNA a analýzy  
molekulárních markerů pro účely  
popisu genových zdrojů a identifikace  
odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.)**

Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV 1B44011: „Vývoj a testování systému analytických metod pro praktickou charakterizaci odrůd brambor registrovaných v ČR“ a výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Alena Nováková  
Ing. Kateřina Šimáčková  
Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.**

**České Budějovice, Září 2008**

i



Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Vladislav Čurn a kol.

[vcurn@seznam.cz](mailto:vcurn@seznam.cz)

Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice 2008  
[www.zf.jcu.cz](http://www.zf.jcu.cz), <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV 1B44011: „Vývoj a testování systému analytických metod pro praktickou charakterizaci odrůd brambor registrovaných v ČR“ a výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“

Recenzenty metodiky byli:

Ing. Petra Hlásná – Čepková, Ph.D.  
ITS ČZU Praha - Suchdol

MUDr. Hana Hájková  
ÚKZÚZ, NRL-OMB, Hroznová 2, Brno

*Text:* ©2008 Čurn V., Nováková A., Šimáčková K., Kubátová B.

*Foto:* ©2008 Čurn V., Bárta J.

*Grafická úprava:* ©2008 Šimáčková K.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-135-2

Obsah:

<b>I. Cíl metodiky</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>3</b>
II.1. Úvod.....	3
II.2. Metodika izolace DNA .....	5
Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA brambor.....	5
Metody izolace DNA brambor .....	6
Izolace DNA pomocí <i>DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)</i> .....	6
Izolace DNA s použitím <i>Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITTEK)</i> .....	7
Izolace DNA pomocí <i>CTAB (Williams et al. 1992)</i> .....	8
Izolace DNA pomocí <i>CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)</i> .....	9
Izolace DNA pomocí <i>CTAB a současného přidání PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)</i> ....	11
<i>SDS extrakce podle Edwardse et al. (1991)</i> .....	13
<i>Extrakce DNA Kirby roztokem (Covey a Hull 1981)</i> .....	13
Izolace rostlinné DNA podle <i>Jobese, Hurleye a Thiena (1995)</i> .....	14
Porovnání jednotlivých metod izolace DNA.....	17
II.3. Metodika analýzy DNA markerů.....	19
RAPD (random amplified polymorphic DNA) .....	19
SSR (single sequence repeat), mikrosatelity.....	21
ISSR (inter single sequence repeat), mikrosatelity.....	23
AFLP (amplified fragment length polymorphism).....	24
II.4. Metodika elektroforézy DNA .....	29
Elektroforéza v agarózovém gelu .....	29
Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	33
Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu – denaturační elfo.....	35
Elektroforéza v SYNERGELu.....	37
Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:.....	38
II.5. Metodika analýzy molekulárních dat .....	39
Digitální obrazová analýza .....	39
<b>III. Srovnání novosti postupů</b> .....	<b>41</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>42</b>

<b>V. Seznam použité související literatury.....</b>	<b>43</b>
<b>VI. Seznam publikací, které předcházely metodice.....</b>	<b>47</b>
<b>VII. Příklady výstupů analýzy molekulárních markerů.....</b>	<b>49</b>
<b>VIII. Katalog morfometrických, bílkovinných a DNA markerů.....</b>	<b>53</b>

## I. Cíl metodiky

Rok 2008 je z pohledu bramborářství oproti ostatním rokům obzvláště významný, neboť OSN jej vyhlásila Mezinárodním rokem brambor. Heslem se stalo „HIDDEN TREASURE“, neboli SKRYTÝ POKLAD, či spíše SKRYTÉ BOHATSTVÍ. Brambory jsou celosvětově významnou plodinou, řadí se do tetrády nejvýznamnějších plodin. V současné době se pěstují na téměř 20 mil. ha a celosvětově je registrováno přes 4200 odrůd, které jsou pěstovány ve více než 100 zemích světa (Hamester and Hils 2003, Hils and Pieterse 2007). V České republice je ve Státní odrůdové knize zapsáno 161 odrůd – stav z roku 2008 (ÚKZÚZ 2008). Platný zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a vyhláška na něj navazující (Vyhláška MZe č. 332/1997 Sb.) vyžadují u konzumních brambor garanci odrůdové deklarace při obchodním styku.

Předkládaná metodika je zacílena na využití molekulárních markerů na bázi analýzy DNA pro účely popisu a identifikace jednotlivých odrůd, pro účely verifikace odrůdové pravosti a čistoty sadby. Použité postupy lze využít i pro popis a charakterizaci šlechtitelských materiálů a genových zdrojů používaných ve šlechtění.

## II. Vlastní popis metodiky

### II.1. Úvod

Kulturní brambor, *Solanum tuberosum* L., je jednou ze čtyř nejcennějších plodin světa spolu s pšenicí, rýží a kukuřicí. Jeho uplatnění nalezneme jak ve výživě lidí, tak i ve výživě hospodářských zvířat. Významné je i jeho využití pro účely průmyslového zpracování.

Již v roce 1957 označil Carson odrůdu za základ moderní hospodářské produkce, a poznamenal, že rozdíl mezi ziskem či ztrátou může být ovlivněn právě zvolením vhodné odrůdy. Hlavním zájmem ve šlechtění hospodářských plodin je tedy získávání nových odrůd, které by se vyznačovaly vyššími výnosy, výhodnějšími kvalitativními znaky a rezistencí k biotickým a abiotickým faktorům. V mnohých případech jsou donory těchto zlepšujících znaků (kromě výnosu) plané druhy. Použití molekulárních markerů umožňuje efektivnější využití takovýchto genových zdrojů ve šlechtění brambor (Callow et al., 1997).

Šlechtitelé a množitelé brambor stejně tak jako státní kontrolní orgány potřebují spolehlivé prostředky pro identifikaci odrůd, které by mohly být rutinně aplikovány na velký počet vzorků. Tento úkol je složitý, neboť na celém světě je více než 4000 odrůd brambor (Pieterse and Hils, 2007) a velký počet jich je nadále ročně registrován. Tradiční postup identifikace a popisu odrůd, genových zdrojů a šlechtitelských materiálů je založen především na hodnocení fenotypu. Odrůdy jsou identifikovány na základě morfologických znaků a vlastností, fyziologických a biochemických popisů. Tento postup je ale velmi zdlouhavý, protože některé diskriminační znaky jsou zaznamenávány na úrovni klíčků, charakteru trsu a listů či hlíz (Cooke and Reeves, 1998). Moderní postupy a přístupy zahrnují využití metod molekulární biologie a jsou založeny na analýze isoenzymů, proteinů a DNA. Obrovský rozvoj metody PCR, která byla poprvé použita v roce 1984 (Saiki et al., 1985, 1988), vedl k vývoji celé řady technik a metodických postupů využívaných i pro popis a identifikaci genotypů rostlin. Metody markerování na úrovni molekulárních a biochemických markerů se tak staly účinným nástrojem stanovování genetické variability, který umožňuje charakterizaci jednotlivých genotypů (Görg et al., 1992).

Mezi prvními molekulárními metodami byly vyvinuty techniky založené na polymorfismu proteinů. Nevýhodou těchto technik je jejich dostupnost pouze pro limitované množství genů. Výsledky těchto technik jsou také ovlivňovány vývojovou etapou rostliny a prostředím (Desborough a Peloquin, 1968).

V posledních dvou dekadách je použití molekulárních markerů pro šlechtění kulturních plodin uplatňováno na základě přesně zjištěné genetické variability získané pomocí DNA analýz (Staub et al., 1996), a proto již není detekce požadovaných znaků ovlivněna faktory prostředí. Od objevení molekulárních markerů pro analýzu rostlinného genomu se selekce zaměřuje na zjišťování

genotypu na místo fenotypu, což umožňuje využití *molecular marker assisted selection* (MMAS) (Paterson et al., 1991). Použití molekulárních markerů ve šlechtění brambor otevírá nové příležitosti pro selekci žádaných genotypů.

V současné době je v České republice registrováno 161 odrůd brambor (ÚKZÚZ 2008), z nichž téměř 70% jsou produkty zahraničních (evropských) šlechtitelských subjektů. Ochrana práv šlechtitelů k odrůdám je v České republice zajišťována podle zákona č.132/1989 Sb., o ochraně práv k novým odrůdám rostlin a plemenům zvířat, který upravuje práva a povinnosti vznikající z vytvoření nových odrůd a z jejich obchodního využívání. Systém ochrany odrůd formulovaný tímto zákonem odpovídá principům Mezinárodní úmluvy na ochranu nových odrůd rostlin z roku 1961 podle UPOV (Union Internationale pour la Protection des Obtentions Vegetales), ve znění jejích revizí z roku 1972 a 1978 (Souček, 1997). Nicméně klasická morfometrická charakterizace odrůd přestává být v tomto objemu registrovaných odrůd účinná, obzvláště na úrovni hlíz. Potřeba identifikovat konkrétní odrůdu na úrovni hlíz je přitom nejdůležitější, především z obchodního hlediska. Platný zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a vyhláška na něj navazující (Vyhláška MZe č. 332/1997 Sb.) vyžadují u konzumních brambor garanci odrůdové deklarace při obchodním styku. Kontrolní orgány SZPI potřebují vhodný nástroj pro ověřování odrůdové deklarace u konzumních brambor. Ten jim zatím poskytují, i přes určitá rizika, elektroforetická spektra zásobních bílkovin. Toto hodnocení je založeno na principu porovnávání profilu hlízových bílkovin ověřovaného vzorku s profilem garantovaného standardu. Tyto metody identifikace a verifikace odrůd brambor se mohou velmi vhodně uplatnit jak ve šlechtění, tak i v kontrole odrůdové pravosti, např. při obchodování s konzumními bramborami (Sýkorová, 1999). DNA markery zatím nejsou pro tento účel v ČR používány.

Nicméně přístup založený na analýze biochemických markerů (isoenzymů a proteinů) má řadu limit – vliv prostředí, skladování, nedostatečná míra polymorfismu. Výrazný pokrok v oblasti vývoje molekulárních markerů založených na analýze DNA vede k potřebě doplnit stávající spektrum používaných markerů o techniky a markery postavené na principu detekce polymorfismu na úrovni DNA. Předkládaná metodika popisu a identifikace genotypů brambor vychází z publikovaných i originálně navržených postupů a podává přehled o metodách izolace DNA brambor z různých částí rostliny a metodách analýzy RAPD, AFLP, SSR a ISSR markerů.

## II.2. Metodika izolace DNA

### ***Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA brambor***

- klíčky z naklíčených hlíz brambor
- listy (zdravé, nepoškozené)
- hlízy (zdravé, nepoškozené, umyté, osušené)

DNA izolujeme dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu (odebraného v laboratoři nebo v polních podmínkách a uchovávaného do doby izolace na ledu po dobu 2–4 hod), nebo z materiálu zamraženého (po odebrání materiál zamrazíme a uchovááme v  $-80^{\circ}\text{C}$ ). V případě izolace DNA z hlíz je možné využít i lyofilizovaného materiálu (z hlízy ukrojíme tenký plátek z celého profilu hlízy, tento plátek je zamrazíme v  $-80^{\circ}\text{C}$  a následně lyofilizujeme, po lyofilizaci plátek rozdrtíme a homogenizujeme a získaný prášek je uchovááme v  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

- hlízová šťáva

Hlízovou šťávu získáváme dle metodiky UPOV (UPOV 2002) z hlíz, které jsou omyty, zmrazeny v  $-20^{\circ}\text{C}$  a po jejich rozmražení vymačkáme hlízovou šťávu. Z takto získané hlízové šťávy DNA izolujeme dle příslušného protokolu.

- lyofilizovaný materiál

Jedná se o materiál, který získáme ze všech předchozích typů vzorků po jejich lyofilizaci (šetrné vysušení při nízké teplotě ve vakuu). Lyofilizovaný materiál uchovááme v uzavřených mikrocentrifugačních zkumavkách v mrazáku při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Metody izolace DNA brambor**

DNA izolujeme ze všech výše uvedených typů materiálu (klíčky, listy, hlízy, hůžová šťáva), a to jak z materiálu čerstvého tak zamraženého nebo lyofilizovaného. Výtěžnost, čistota a použití takto získané DNA jsou diskutovány na závěr této kapitoly.

DNA je možno izolovat mikroextrakčními metodami (komerčně dostupnými kity) nebo pomocí standardních metod izolace DNA (získání většího množství DNA).

### **Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)**

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon – na první koloně dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé koloně dochází k zachycení DNA a jejímu následnému vymytí elučním roztokem.

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogenizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, které můžeme použít je 100 mg.

1. K homogenizovanému vzorku přidáme 400  $\mu$ l pufru AP1 předehřátého na 65°C a 4  $\mu$ l RNázy A (20 mg/ml). Důkladně protřepeme na vortexu. Směs inkubujeme 10 min. při 65°C, během inkubace mikrocentrifugační zkumavku 2–3x převrátíme.
2. Přidáme 130  $\mu$ l pufru AP2, promícháme a inkubujeme 5 min. na ledu.
3. Lyzát přeneseme do QIAshredder kolonek a centrifugujeme 2 min. při 8000 rpm. Při pipetování lyzátu do kolonek je nutné odstříhnout špičku pipety. Přes filtr projde do sběrné nádoby i malá část mrtvých buněčných pletiv a sraženin, kde vytvoří pelet.
4. Supernatant přeneseme do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Většinou získáme 450  $\mu$ l supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.
5. Přidáme 0,5 dílu pufru AP3 a 1 díl etanolu (96–100%) a promícháme pomocí pipety. Př.: 450  $\mu$ l supernatantu + 225  $\mu$ l pufru AP3 + 450  $\mu$ l etanolu.
6. 650  $\mu$ l směsi z kroku 5 (včetně sraženin) přeneseme do DNeasy kolonek, centrifugujeme 1 min. při  $\geq$  8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
7. Opakujeme krok 6 se zbývajícím vzorkem, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky.
8. DNeasy kolonky umístíme do nových centrifugačních zkumavek, přidáme 500  $\mu$ l pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 1 min. při  $\geq$  8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
9. Přidáme 500  $\mu$ l pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 2 min. při maximálních otáčkách až do vysušení membrány v kolonce, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky. DNeasy kolonky vyndáme



opatrně z centrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku etanolem obsaženým ve filtrátu.

10. DNeasy kolonky přeneseme do 1,5 ml (2 ml) mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100  $\mu$ l pufru AE (zahřátého na 65°C) přímo na membrány kolonek a centrifugujeme 1 min. při  $\geq$  8000 rpm. Eluci můžeme zopakovat (do nové mikrocentrifugační zkumavky).

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

### ***Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)***

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogenizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, kterého můžeme použít je 100 mg.

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme cca 60 mg rostlinného pletiva. Homogenát přeneseme do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 400  $\mu$ l Lysis Buffer P a 20  $\mu$ l proteinázy K. Vortexujeme a necháme 30 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace 2 – 3krát promícháme. Připravíme si Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube.
2. Vzorky přeneseme na Spin Filter. Centrifugujeme 10 min. při 12000 rpm. Pokud je to nutné přidáme 40  $\mu$ l Rnázy A (10 mg/ml), vortexujeme a necháme 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
3. Přidáme 200  $\mu$ l Binding Buffer P a vortexujeme.
4. Umístíme nové Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube, přeneseme vzorky a 1 min. inkubujeme. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm.
5. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
6. Přidáme 550  $\mu$ l Wash Buffer I a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
7. Přidáme 550  $\mu$ l Wash Buffer II a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok opakujeme. Nakonec centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.
8. Spin Filter umístíme do nových 1,5 ml Receiver Tube a přidáme 50 – 100  $\mu$ l Elution Buffer D předehřátého na 65°C. Inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidáme 50  $\mu$ l Elution Buffer D přehřátého na 65°C a inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm. Postup opakujeme znovu s dalšími 50  $\mu$ l Elution Buffer D, ale do nové 1,5 ml Receiver Tube. Vznikne nám tak 50  $\mu$ l 1. a 2. eluátu.

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

### ***Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)***

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500  $\mu$ l roztoku. Připravený roztok dáme přehřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
  - V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x CTAB a 1% 2-merkptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l přehřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrům. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 500  $\mu$ l směsi fenol–chloroform–IAA, 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 500  $\mu$ l směsi chloroform–IAA, 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250  $\mu$ l). 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min. při 4°C

maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant. Pelet usušíme.

7. Přidáme 300  $\mu$ l 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 600  $\mu$ l ledového (z mrazáku) 100% ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant (pipetujeme 2x). Necháme dobře usušit.
10. Přidáme 400  $\mu$ l ledového 70% ethanolu. 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechny supernatant. Vzorky necháme dobře usušit (cca 10 min.).
11. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200  $\mu$ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1  $\mu$ l Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkptoetanol)
- 2-merkptoetanol
- fenol-chloroform-IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform-IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

#### ***Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)***

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon) odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný

(0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500  $\mu$ l roztoku. Připravený roztok dáme předehřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužijeme tekutý dusík do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
  - V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l předehřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Po centrifugaci 12000 rpm 10 min. se převede supernatant (500  $\mu$ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 500  $\mu$ l chloroformu s IAA, směs se 10 min. promíchává a následně centrifuguje 5 min. při 12000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5% CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500  $\mu$ l směsi chloroformu–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250  $\mu$ l) a 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. (až na noc) do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 300  $\mu$ l 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 2 objemy (600  $\mu$ l) ledového (z mrazáku) 100% ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
10. Přidáme 1 ml ledového 70% ethanolu, 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechny supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200  $\mu$ l 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpustit 40 min. při 37°C).

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1  $\mu$ l Rnazy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

**Chemikálie:**

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkptoetanol, 1% PVP–40000)
- 2-merkptoethanol
- 5% CTAB
- chloroform–IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

**Přístroje:**

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

***Izolace DNA pomocí CTAB a současného přidání PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)***

1. Připravíme si roztok 2x CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500  $\mu$ l roztoku. Připravený roztok dáme předehřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
  - V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x CTAB a 1% 2-merkptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l předehřátého pufru a cca 50 mg PVPP (polyvinylpolypyrrolidon), pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 500  $\mu$ l směsi fenol–chloroformu–IAA, 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 500  $\mu$ l směsi chloroformu–IAA, 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250  $\mu$ l). 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. do mrazáku (-20°C). V tomto kroce, je možno práci přerušit a ponechat vzorky v mrazáku 12 hod. Centrifugujeme 5 min. při 4°C

maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant. Pelet usušíme.

7. Přidáme 300  $\mu$ l 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 20  $\mu$ l 7,5 M octanu sodného a 600  $\mu$ l ledového (z mrazáku) 100% ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Vzorokly dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorokly vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant (pipetujeme 2x). Necháme dobře usušit.
10. Přidáme 400  $\mu$ l ledového 70% ethanolu. 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechny supernatant. Vzorokly necháme dobře usušit (cca 10 min).
11. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200  $\mu$ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1  $\mu$ l Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

#### Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% 2-merkaptoetanol)
- 2-merkaptoethanol
- PVPP (polyvinylpyrrolidon)
- fenol–chloroform–IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform–IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

#### Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

### **SDS extrakce podle Edwardse et al. (1991)**

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogenizátorkem přímo v eppendorfce. Maximální množství rostlinného pletiva, které můžeme použít je 500 mg.

1. 0,5 g listového pletiva homogenizujeme ve 100 µl extrakčního pufru v mikrocentrifugační zkumavce.
2. K homogenátu přidáme 300 µl extrakčního pufru a 5 s vortexujeme. Tato extrakční směs může být ponechána při laboratorní teplotě i déle než 1 hodinu, dokud nejsou všechny vzorky homogenizovány.
3. Extrakt centrifugujeme 1 min. při 13000 rpm a 300 µl supernatantu přeneseme do čisté mikrocentrifugační zkumavky.
4. K supernatantu přidáme 300 µl isopropanolu vychlazeného na -20°C a směs necháme 2 min. srážet. Centrifugujeme 5 min. při 13000 rpm.
5. Osušený pelet rozpustíme ve 100 µl TE pufru. DNA je stabilní ve 4°C déle než 1 rok.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- extrakční pufr (200 mM Tris-HCl, pH=7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS)
- chloroform-IAA (24 : 1)
- isopropanol
- TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH=7,5; 0,1 mM EDTA)

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

### **Extrakce DNA Kirby roztokem (Covey a Hull 1981)**

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík dáme rostlinné pletivo do mikrocentrifugační zkumavky, přidáme sterilní křemičitý písek a 500 µl extrakčního pufru (Kirbyho roztoku).

1. Pletivo rozrušíme a 30 s vortexujeme.
2. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě. Můžeme odpipetovat vodnou fázi bez zbytků pletiva a přepipetovat ho do nových mikrocentrifugačních zkumavek.

Dále postupujeme podle protokolu viz. CTAB izolace od bodu 4.

**Chemikálie:**

- kapalný dusík
- Kirbyho roztok (1% Tri-izopropyl naftalen síran (sodná sůl); 6% 4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina; 50 mM Tris-HCl (pH=8,3); 6% fenol (nasyčen 200 mM Tris-HCl, pH=7); 10 mM EDTA; doplníme destilovanou vodou do 100 ml)
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM TrisHCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% 2-merkaptoethanol)
- 2-merkaptoethanol
- fenol-chloroform-IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform-IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

**Přístroje:**

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogénizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

***Izolace rostlinné DNA podle Jobese, Hurleye a Thiena (1995)***

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý provádíme homogenizaci s extrakčním pufrém.

1. Připravíme si roztok extrakčního pufru, ke kterému přidáme proteinázu K (10 mg/ml). Na jeden vzorek počítáme 0,1 g rostlinného pletiva, 1 ml extrakčního pufru a 50  $\mu$ l proteinázy K. Připravený roztok dáme předehřát na 55°C.
2. Do sterilních mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 0,1 g), ze kterého chceme izolovat DNA a homogénizujeme ho homogénizátorkem. Přidáme 1 ml extrakčního pufru smíchaného s proteinázou K a znovu promícháme homogénizátorkem.
3. Vortexujeme asi 15 s.
4. Vzorky dáme inkubovat do 55°C na 60 min.
5. Přidáme 80  $\mu$ l 20% SDS (dodecylsírán sodný), promícháme, znovu vortexujeme a necháme 1–2 hodiny inkubovat při 55°C.
6. Centrifugujeme 10 min. při 14 000 rpm, při 4°C.
7. Supernatant přepipetujeme do nové mikrocentrifugační zkumavky a přidáme 1/3 objemu (cca 300  $\mu$ l) octanu draselného (pH=4,8). Lehce promícháme (nevortexujeme) a dáme na 30 min. do -20°C.
8. Centrifugujeme 10 min. při 14000 rpm, při 4°C.



9. Supernatant přepipetujeme do nové mikrocentrifugační zkumavky a přidáme 0,6 objemu (cca 600  $\mu$ l) isopropanolu. Lehce promícháme a dáme na 30 min. do  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. Centrifugujeme 10 min. při 14000 rpm, při  $4^{\circ}\text{C}$ .
11. Odstraníme supernatant a pelet rozpustíme ve 200  $\mu$ l sterilní vody. Pokud se pelet špatně rozpouští, dáme vzorky inkubovat do  $37^{\circ}\text{C}$  cca 30 min.
12. Přidáme 0,5 objemu (cca 100  $\mu$ l) 5 M NaCl a dobře promícháme. Potom přidáme 2,0 objemu (cca 400  $\mu$ l) ledového (z mrazáku) 95% ethanolu a necháme 30 min. inkubovat při  $-20^{\circ}\text{C}$ .
13. Centrifugujeme 10 min. při 14000 rpm, při  $4^{\circ}\text{C}$ .
14. Odstraníme supernatant a pelet rozpustíme v 500  $\mu$ l sterilní vody. Pokud se pelet špatně rozpouští, dáme vzorky inkubovat do  $37^{\circ}\text{C}$  cca 30 min.
15. Přidáme 500  $\mu$ l směsi fenol–chloroform–IAA a 10 min. protřepáváme.
16. Centrifugujeme 5 min. při 14000 rpm, při pokojové teplotě.
17. Přepipetujeme vodnou fázi do nové mikrocentrifugační zkumavky (cca 500  $\mu$ l) a přidáme 500  $\mu$ l směsi chloroform–IAA a 10 min. protřepáváme.
18. Centrifugujeme 5 min. při 14000 rpm, při pokojové teplotě.
19. Přepipetujeme vodnou fázi do nové mikrocentrifugační zkumavky a přidáme 0,6 objemu (cca 250  $\mu$ l) isopropanolu. Vzorky necháme inkubovat 30 min. při  $-20^{\circ}\text{C}$ .
20. Centrifugujeme 10 min. při 14000 rpm, při  $4^{\circ}\text{C}$ .
21. Odstraníme supernatant a pelet omyjeme cca 300  $\mu$ l 70% ethanolu.
22. Centrifugujeme 5 min. při 14000 rpm, při  $4^{\circ}\text{C}$ .
23. Odstraníme ethanol a pelet osušíme.
24. DNA rozpustíme v TE pufru nebo sterilní vodě.

#### Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- extrakční pufr (100 mM octan sodný (pH=4,8); 100 mM EDTA (pH=8,0); 500 mM NaCl; 10 mM DTT; 2% (w/v) PVP (polyvinylpyrrolidon); pH upravit na 5,5; bezprostředně před použitím přidat proteinázu K (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ))
- 5 M octan draselný (pH=4,8)
- TE pufr
- 20% (w/v) SDS
- 1 M DTT
- 5 M NaCl
- 100% isopropanol
- 70% ethanol
- fenol–chloroform–IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform–IAA (24 : 1)
- sterilní voda
- šupinkový led

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

## Porovnání jednotlivých metod izolace DNA

Vzhledem k tomu, že techniky analýzy DNA markerů mají být rutinně používány v běžné praxi pro identifikaci a charakterizaci odrůd brambor, je nutné aby byla k tomuto účelu používána taková metoda extrakce DNA, která bude optimalizována pro toto uplatnění. Za optimální je považována taková metoda, která bude na straně jedné prakticky a ekonomicky nenáročná a na straně druhé bude poskytovat dostatečný výtěžek DNA schopné dalších analýz. Takto vybraná „kompromisní“ a optimalizovaná metoda pak umožní extrahovat co největší počet vzorků za jednotku času (např. denně) při uspokojivé vysoké kvalitě DNA a za současné ekonomické únosnosti.

Pro volbu vhodné techniky extrakce DNA byly použity čtyři druhy rostlinného materiálu: 1/ čerstvé pletivo z hlízy bramboru, 2/ čerstvé listy, 3/ klíčky a 4/ hlízová šťáva získaná po vymačkání důkladně očištěné, omyté a zmražené hlízy. Před izolací DNA byla hlíza opět rozmrazena, po rozkrojení z ní bylo vymačkáno 5 ml šťávy, ke které bylo přidáno 100 µl konzervantu ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$  +  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Takto získaná šťáva byla přímo používána pro izolaci DNA. Pro stanovení optimální techniky izolace DNA bramboru byly používány paralelně jak rostlinné pletivo z hlízy, tak vymačkaná šťáva. Kromě izolace z čerstvé hmoty byla prováděna izolace ze zamraženého materiálu a v případě hlíz i z lyofilizovaných vzorků.

V tabulce 1 jsou porovnány sledované charakteristiky při hledání optimální metody izolace DNA.

Tab. 1: Porovnání metod izolace DNA.

Metoda	Cena [Kč]	Doba izolace [h]	Počet vzorků na den**	Pracnost ***	Práce s fenolem	Výtěžek roztoku DNA [µl]	Koncentrace roztoku DNA [ng/ml]	Výtěžek DNA [ng]
CTAB	10	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 100	200-400	2-40
CTAB+PVP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 100	200-400	2-40
CTAB+PVPP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 100	200-400	2-40
KIRBY	9	7-8 (2dny)*	24	3	ano	10 - 100	1-10	0,1-1
SDS	7	4-6	2 x 24	2	ne	10 - 100	1-10	0,1-1
JOBES	13	12	24	5	ano	10 - 100	1-10	0,1-1
INVITEK	72	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	0,5-1	0,05-0,1
QIAGEN	120	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	0,5-1	0,05-0,1

\* osm hodin, ale rozloženo do dvou dnů

\*\* standardní laboratoř, 1 pracovní linka, 1 centrifuga s rotorem pro 24 mikrocentrifugačních zkumavek

\*\*\* 1 – nejméně náročný, 5 – nejvíce náročný postup

Bylo testováno osm metod extrakce DNA: šest klasických metod izolace DNA – izolace rostlinné DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992) a pomocí CTAB s přidáním PVP nebo PVPP, extrakce rostlinné DNA Kirbyho roztokem (Covey a

Hull 1981), SDS extrakce (Edwards et al. 1991), izolace rostlinné DNA dle Jobes et al. (1995) a dvě metody při nichž byl používán komerčně dodávaný kit pro izolaci rostlinné DNA Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK) a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

Podle sledovaných charakteristik byla jako optimální metoda pro účely analýzy mikrosatelitů vybrána izolace pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK), která nejlépe splňovala sledované vlastnosti. Tato metoda je srovnatelná s izolací pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN), oproti DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN) je ale cenově výhodnější. Vyšší cena „kitové“ izolace oproti standardním metodám izolace byla vyvážena faktem, že jsou získány standardní vzorky DNA, opakovatelné a reprodukovatelné u celého spektra odrůd. DNA je získána v kvalitě, která umožňuje bezproblémovou analýzu širokého spektra DNA markerů. V této metodě jsou spojeny požadavky na jednoduchou standardní a rychlou metodu, která bude moci být uplatněna v běžné praxi.

Pro optimalizaci metod a pro účely hodnocení AFLP markerů a markerů odvozených z retrotranspozonů je ale pro izolaci DNA vhodnější CTAB–PVP metoda. U této metody lze modifikovat jednotlivé kroky, je dosahována vyšší výtěžnost a čistota DNA, není ale vhodná pro velkosériové izolace a pro případy jednoduchých screeningových analýz. Všechny tři metody izolace založené na použití CTAB (metoda CTAB, metoda CTAB-PVP a metoda CTAB-PVPP) mají stejné parametry při základním porovnání (pracnost, množství izolované DNA). Odlišnost je zejména v kvalitě a čistotě DNA a spolehlivosti izolace. Tyto dva poslední parametry se projevily u náročnějších technik, jako jsou AFLP a retrotranspozonové markery. U méně náročných technik (analýzy ITS, mikrosatelity) jsou tyto techniky srovnatelné a poskytují stejné výsledky.

Při srovnání izolace DNA z různých výchozích typů rostlinného materiálu, byla pro rutinní analýzy mikrosatelitů upřednostněna izolace DNA z vymačkané šťávy. Především proto, že poskytovala velmi jednoduchou a rychlou počáteční přípravu vzorků. Pro účely analýzy AFLP markerů a markerů odvozených z retrotranspozonů je ale nutné použít lyofilizovaný materiál nebo vzorky listů či hlíz. V případě izolace DNA z hlízové šťávy není dosahováno požadovaného minimálního výtěžku DNA a rovněž koncentrace izolované DNA je nižší. Lyofilizovaný materiál lze získat velmi jednoduchým způsobem, zůstává zachována integrita DNA, lyofilizované vzorky je možné velmi dlouho uchovávat bez rizika zhoršení parametrů izolované DNA. Jedinou nevýhodou této metody je potřeba přístrojového vybavení – lyofilizátoru.

## II.3. Metodika analýzy DNA markerů

### ***RAPD (random amplified polymorphic DNA)***

RAPD analýza je metoda založená na PCR technologii. Mezi její výhody patří rychlost (je použitelná pro rychlý screening a identifikaci vzorků) a potřeba jen velmi malého množství templátové DNA. Vzhledem k tomu, že při RAPD analýze jsou využívány náhodně generované primery, není pro její provedení vyžadována znalost cílových sekvencí a studovaného genomu. RAPD detekuje polymorfismus v celém genomu. Tato technika je pro studium a charakterizaci genotypů brambor doposud nejvíce používanou technikou. Waugh et al. (1992) použili techniku RAPD při detekci genové introgrese u druhu *Solanum tuberosum*. RAPD markery byly rovněž použity při studiu genetických vztahů mezi monoploidy, dvojitými monoploidy a ostatními donorovými genotypy (Singsit, Ozias-Akins, 1993), při určování genetické diverzity brambor (Demeke et al., 1996; Paz & Veilleux, 1997) a při hodnocení genetické variability mezi vnitrodruhovými somatickými hybridy (Gavrilenko et al., 1999). Pro charakterizaci odrůd brambor použili techniku RAPD Demeke et al. (1993); Hosaka et al. (1994); Sosinski & Douches (1996); Organisyan et al. (1996); Ford and Taylor (1997); Chakrabarti et al. (1998, 2001); Pattanayak et al. (2002) a Chakrabarti et al. (2006) upozorňuje na jednu z hlavních nevýhod této metody a to nestabilitu poskytnutých spekter v rámci opakování a rovněž zjistil rozdíly ve spektrech v závislosti na izolovaném pletivu a na způsobu pěstování rostlin (skleník vs. polní podmínky). Obdobné výsledky byly získány i na našem pracovišti (Nováková et al. 2008).

Pro RAPD analýzu u brambor byly pro účely předkládané metodiky použity náhodné primery (OPERON Technologies, CA), sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Sekvence náhodných primerů používaných pro RAPD analýzu u brambor.

Primer	Sekvence '5—3'
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-13	CAGCACCCAC
OPB-01	GTTTCGCTCC
OPB-06	TGCTCTGCC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-17	AGGGAACGAG
a další primery Operon – sekvence viz : <a href="https://www.operon.com/stock/rapd_10mer_price.php">https://www.operon.com/stock/rapd_10mer_price.php</a>	

Protokol RAPD analýzy vychází z metodiky Williams et al. (1990) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Sobotka et al. (2004) a Čurn et al. (2005).

PCR reakce probíhá v objemu 25  $\mu$ l, v 1x reakčním pufru (10 mM Tris-HCl, pH=8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100), 100  $\mu$ M dNTP, 10 pM primeru (Operon Technologies, serie A, B, F, H a K), 1 U Taq polymerázy (TAKARA) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém TAKARA:

- 2,5  $\mu$ l 10x reakčního pufru
- 2,0  $\mu$ l dNTPs
- 1  $\mu$ l DNA
- 2  $\mu$ l primeru
- 0,2  $\mu$ l DNA polymerázy (1 U)
- 17,3  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25  $\mu$ l)

Alternativně je možné použít komerčně dodávané „master mixy“. PCR reakce pak probíhá v objemu 25  $\mu$ l, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu$ M dNTP, 10 pM primeru (Operon Technologies, serie A, B, F, H a K), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5  $\mu$ l PPP master mixu
- 1  $\mu$ l DNA
- 2  $\mu$ l primeru
- 9,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25  $\mu$ l)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min. 94°C
- 45 cyklů: 1 min. 94°C  
2 min 35°C  
3 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. RAPD profily se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

RAPD fingerprinty se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager for Windows, BioSystematica; UltraQuant) a získaná primární data přítomnosti či nepřítomnosti daného markeru se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl<sub>2</sub> nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

### **SSR (single sequence repeat), mikrosatelity**

Za mikrosatelity se považují tandemově uspořádaná krátká opakování s délkou motivu 2–4 párů bází (Morgante and Olivieri, 1993). Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50 ti kopiích. Ashkenazi et al. (2001) odhadli při studiu pěti rozdílných motivů, že u brambor mohou být mikrosatelity nalezeny každých 52 kb.

DNA fingerprinting založený na SSR markerech použili pro identifikaci tetraploidních klonů brambor (Kawchuk et al., 1996; Provan et al., 1996; Schneider a Douches, 1997; Ghislain et al., 2000; McGregor et al., 2000; Ashkenazi et al., 2001). Coombs et al. (2004) použil 18 SSR primerových kombinací pro identifikaci 17 odrůd brambor. Polymorfismus byl pozorován u 14 ti SSR primerových kombinací při použití agarózové elektroforézy a u 18 ti SSR primerových kombinací při použití PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforézy. Žádný z primerů nedokázal rozlišit samostatně všech 17 odrůd brambor. Užití mikrosatelitů (SSR) pro fylogenetické a fingerprintové analýzy u brambor studovali Ashkenazi et al. (2001) a potenciál techniky PCR–ISSR pro fingerprinting odrůd brambor posuzovali Prevost a Wilkinson (1999). McGregor et al. (2000) hodnotili navzájem možnosti molekulárních markerů – RAPD, AFLP, ISSR a SSR – pro fingerprinting odrůd brambor na modelovém souboru 39 odrůd. Zjistili, že všechny techniky jsou schopné rozlišit všechny odrůdy tohoto souboru. Nicméně jednotlivé techniky se lišily hodnotou tzv. genotypového indexu, který blíže charakterizuje možnosti jednotlivých technik (pro AFLP GI = 1,0; RAPD GI = 0,53; ISSR GI = 0,47 a pro SSR GI = 0,36).

Pro SSR analýzu u brambor byly pro účely předkládané metodiky použity primerové páry STM 2005, STM 1102, STM 3012, STWIN a STG BBS, sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3: Sekvence primerů používaných pro SSR analýzu u brambor.

Primer	Sekvence '5—3'	Teplota nasedání
STM 2005	5'– TTT AAG TTC TCA GTT CTG CAG GG – 3' 5'– GTC ATA ACC TTT ACC ATT GCT GGG – 3'	54°C
STM 1102	5'– GGA AGA ATT TTG TAG GTT CAA – 3' 5'– AAA GTG AAA CTT CCT AGC ATG – 3'	55°C
STM 3012	5'– CAA CTC AAA CCA GAA GGC AAA – 3' 5'– GAG AAA TGG GCA CAA AAA ACA – 3'	57°C
STWIN	5'– TGT TGA TTG TGG TGA TAA – 3' 5'– TGT TGG ACG TGA CTT GTA – 3'	54°C
STG BBS	5'– AAT CGG TGA TAA ATG TGA ATG C – 3' 5'– ATG CTT GCC ATG TGA TGT GT – 3'	54°C

Protokol SSR analýzy vychází z metodiky Williams et al. (1990) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Nováková et al. (2008).

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris–HCl, pH=8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer F
- 0,5 µl primer R
- 10,5 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min. 94°C
- 30 cyklů: 30 s 94°C  
30 s 54–57°C, dle příslušného primeru  
1 min 72°C
- konečná elongace 5 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 3% agarózovém gelu nebo 10% PAGE v 1x TBE pufru nebo na 3% Synergelu v 0,5x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Profily se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

Profily SSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager for Windows, BioSystematica; UltraQuant) a primární data se dále statisticky zpracovávají.



Chemikálie:

- PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

**ISSR (inter single sequence repeat), mikrosatelity**

Technika ISSR markerů je modifikací techniky SSR markerů (Zietkiewics et al., 1994; Kantety et al., 1995). Tato technika je založena na použití PCR amplifikace s náhodně ukotveným mikrosatelitovým motivem. Na rozdíl od techniky SSR není při ISSR nutná žádná předchozí znalost sekvence. Hantula et al. (1996), Charters et al. (1996) a Zietkiewics et al. (1994) považují tuto metodu za přesnější a opakovatelnější než metodu RAPD. Metoda ISSR markerů zároveň poskytuje větší polymorfismus. ISSR markery jsou dominantní, ačkoli někteří autoři udávají i jejich kodominantní charakter (Fischer et al., 1996).

Pro ISSR analýzu u brambor byly pro účely předkládané metodiky použity primery P1, P2, P3, P4 a B1, sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Sekvence primerů používaných pro ISSR analýzu u brambor.

Primer	Sekvence '5—3'	Teplota nasedání
P1	ACA CAC ACA CAC ACA CG	55°C
P2	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	55°C
P3	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	55°C
P4	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	55°C
B1	CAC ACA CAC ACA GT	55°C

\*(Y = C nebo T)

Protokol ISSR analýzy vychází z metodiky *Prevost and Wilkinson (1999) upravené* na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Nováková et al. (2008).

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 1 µl primeru
- 10,5 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min. 94°C
- 40 cyklů: 30 s 94°C  
30 s 55°C  
1 min 72°C
- konečná elongace 7 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 2% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. ISSR profily se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

Profily ISSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager for Windows, BioSystematica; UltraQuant) a primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

### ***AFLP (amplified fragment length polymorphism)***

Technika AFLP kombinuje principy technik RFLP a PCR (Vos et al., 1995). Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí současně dvěma restričními endonukleázami. Na vzniklou populaci restričních fragmentů se ligují adaptory o známe sekvenci a provádí se preselektivní amplifikace. Primery pro tento amplifikační krok jsou komplementární k adaptorům s dalším selektivním nukleotidem na 3'– konci. Selektivní amplifikace se pak provádí s primery se třemi selektivními nukleotidy (v případě rostlin resp. objektů s velkým genomem). U AFLP dochází ke kombinaci specifčnosti restričního štěpení se snadností PCR. Polymorfismus se pak zjišťuje na základě přítomnosti/nepřítomnosti a velikosti amplifikovaných fragmentů po separaci na PAGE nebo na genetickém analyzátoru (sekvenátoru).

Oproti metodám RFPL a RAPD má technika AFLP řadu výhod, mezi nejdůležitější patří generování velkého množství dominantních markerů pokrývajících celý genom. Kromě využití pro identifikaci genotypů kulturních rostlin je cílena zejména pro účely mapování významných kvalitativních a kvantitativních znaků. Tato metoda nachází uplatnění také při studiu biodiverzity, přípravě markerů a genetickém mapování (Ballvora et al., 1995; Meksem et al., 1995; Van Eck et al., 1995). Kim et al. (1998) charakterizovali soubor 12 odrůd brambor technikou AFLP (použili 7 primerových kombinací se třemi selektivními nukleotidy na obou primerech) – ze 466 generovaných pruhů bylo 88% polymorfních mezi odrůdami zvoleného souboru. Van der Voort et al. (1998) vytvořili on-line katalog (<http://www.plantbreeding.wur.nl/Projects/Markers/markers.html>) AFLP markerů (733 chromozómově specifických AFLP markerů) pokrývajících celý genom bramboru.

#### **Restrikce genomické DNA a ligace adaptorů (restrikčně ligační krok):**

Restrikce (50 µl celkový objem):

40 µl vzorku DNA + 1x R/L pufr, 5 U *EcoRI*, 5 U *MseI*

Na 1 vzorek: 4 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *MseI* = 5 U (10 µl restričního master mixu se přidá ke 40 µl templátu DNA, promíchá se a štěpí se 16 h při 37°C)

Ligace (60 µl celkový objem):

50 µl restriční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol *EcoRI* 3' adaptor, 5 pmol *EcoRI* 5' adaptor, 50 pmol *MseI* 3' adaptor, 50 pmol *MseI* 5' adaptor, 1,2 pmol ATP, 1 U T4 DNA ligáza

Na 1 vzorek: 1 µl 10x RL pufru, 0,1 µl *EcoRI*–3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 µl *EcoRI*–5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 µl *MseI*–3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 µl *MseI*–5' adaptoru = 50 pmol, 1,2 µl 10 mM ATP, 1 µl (1 U) T4 Ligase, 6,2 µl vody (10 µl ligačního master mixu se přidá k 50 µl restriční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37°C)

R/L směs se po ukončení ligace naředí 10x T0.1E pufr (540 µl T0.1E pufru + 60 µl R/L směsi)

#### **Pre-selektivní amplifikace (+1/+1) PCR**

Preselektivní amplifikace (50 µl celkový objem):

5 µl vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP's, 75 ng *EcoRI*–A primeru, 75 ng *MseI*–A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 5 µl vzorku, 5 µl PCR pufru, 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 10 mM dNTP's, 0,15 µl *EcoRI*–A primeru (500 ng/µl), 0,15 µl *MseI*–A primeru (500 ng/µl), 0,2 µl Taq (5 U/µl), 36,5 µl vody (45 µl PCR master mixu se přidá k 5 µl vzorku)

**Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:**

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 30 cyklů:
  - 30 s 94°C
  - 30 s 60°C
  - 1 min 72°C
- konečná elongace 9 min 72°C
- stop – 4°C

Po ukončení preselektivní amplifikace se 40 µl reakční směsi 20 x naředí (860 µl TE + 40 µl templátu).

10 µl nenaředěného PCR produktu se použije na elektroforézu (1,2% agarozový gel v 1x TBE/TAE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 0 – 400 bp.

**Selektivní amplifikace (+3/+3) PCR**

Selektivní amplifikace (10 µl celkový objem):

2,5 µl vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP's, 5 ng EcoRI-ANN-FAM primeru, 30 ng MseI-ANN primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 2,5 µl vzorku, 1 µl PCR pufru, 0,2 µl 10 mM dNTP's, 0,087 µl EcoRI-ANN-FAM primeru (10000 pmol), 0,095 µl MseI-ANN primeru (316 ng/µl), 0,1 µl Taq (5 U/µl), 6,018 µl vody  
(7,5 µl PCR master mixu se přidá k 2,5 µl vzorku)

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů:
  - 30 s 94°C
  - 30 s 65°C (-1°C/cyklus)
  - 1 min 72°C
- 25 cyklů:
  - 30 s 94°C
  - 30 s 56°C
  - 1 min 72°C
- konečná elongace 15 min 72°C
- stop – 4°C

**Příprava vzorků na fragmentační analýzu:**

Vzorky jsou připraveny do 96 jamkových destiček (ABI):

11 µl formamidu, 0,4 µl 400 HD Rox Size Standard (ABI), 1,0 µl vzorku (po selektivní amplifikaci)

Vzorky se důkladně promíchají, musí být bez bublinek a jsou v cykleru denaturovány – 4 min. při 95°C. Ihned (!) po ukončení denaturace jsou položeny

na nejméně 2 min. do cold bloku vychlazeného na  $-20^{\circ}\text{C}$ , po té je provedena fragmentační analýza (ABI – automatický genetický analyzátor – sekvenátor) dle manuálu k sekvenátoru.

Chemikálie:

- 10x RL pufr (10 ml zásobní roztok): 0,121g Tris–acetate do 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mM); upravit pH na 7,5 pomocí led. kys. octové; přidat 0,214 g MgAc (octan hořečnatý) (100 mM); 0,491g KAc (octan draselný) (500 mM); 0,077g Dithiothreitol (DTT) (50 mM)
- ATP (10 mM, 100  $\mu\text{l}$  alikvoty, uchovávat v  $-80^{\circ}\text{C}$ ): 0,06 g ATP do 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; upravit pH na 7,0 pomocí 0,1N NaOH; doplnit do 10 ml
- T0.1E pufr: 5 ml 1 M Tris pH=7,5 (8,0), 100  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA, doplnit vodou do 500 ml
- Hi-Di formamid (ABI)
- 400 HD Rox Size Standard nebo 500 Liz Size Standard (ABI)
- templátová DNA
- restrikční enzymy (*Mse*I, *Eco*RI – NEB)
- *Mse* a *Eco* adaptory, *Mse* a *Eco* preselektivní primery, *Eco* fluorescenčně značené selektivní primery, *Mse* selektivní primery
- $\text{dH}_2\text{O}$  (PCR  $\text{dH}_2\text{O}$ , nebo Millipore  $\text{dH}_2\text{O}$ )

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, mrazicí destička, genetický analyzátor

## II.4. Metodika elektroforézy DNA

Klasickou metodou, univerzálně používanou k rozdělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporné elektrody směrem ke kladné. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. Fragmenty o stejné délce postupují stejně rychle a vytvoří proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se dovnitř dvoušroubovice a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, gely jsou po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě.

### *Elektroforéza v agarózovém gelu*

Příprava gelu:

1. Agaróza se smíchá s vodou a pufrům v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozvaří se v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max výkon, nesmí zpěnit); agaróza musí být dokonale rozpuštěná, během rozváření je nutné s Erlenmayerovou baňkou několikrát zamíchat.
2. Roztok agarózy je třeba zchladit na cca 55°C, přidá se odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promíchá a nalije se do připravené vaničky; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu je nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny je zapotřebí eliminovat.
3. Po nalití agarózy je se do vaničky umístí hřebínek a gel se nechá 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je umístěn do elektroforetické vany a pod hladinu pufru jsou do jamek vkládány vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky se naplní dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25 µl) se přidá 4 µl nanášecího pufru (LB), promíchá se špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně je možné nanést vzorky na gel a poté opatrně vložit gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25% bromfenolové modři, 40% (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpipetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 1 µl markeru, 10 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 23 V po dobu 30 min. a poté 90 V po dobu 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- gel je položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotoграфováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

Tab. 5a: Složení 0,7% agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 0,7% agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. V [µl]
50	0,35	49	1	5
100	0,7	98	2	8
150	1,05	147	3	8-10
200	1,4	196	4	12-13

Tab. 5b: Složení 0,7% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 0,7% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. V [µl]
50	0,35	40	10	5
100	0,7	80	20	8
150	1,05	120	30	8-10
200	1,4	160	40	12-13

Tab. 6a: Složení 1,5% agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 1,5% agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. V [μl]
50	0,75	49	1	5
100	1,5	98	2	8
150	2,25	147	3	8-10
200	3	196	4	12-13

Tab. 6b: Složení 1,5% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 1,5% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. V [μl]
50	0,75	40	10	5
100	1,5	80	20	8
150	2,25	120	30	8-10
200	3	160	40	12-13

Tab. 7a: Složení 3,0% agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 3% agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. V [μl]
50	1,5	49	1	5
100	3	98	2	8
150	4,5	147	3	8-10
200	6	196	4	12-13



Tab. 7b: Složení 3,0% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 3% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. V [μl]
50	1,5	40	10	5
100	3	80	20	8
150	4,5	120	30	8-10
200	6	160	40	12-13

Tab. 8: Příprava pracovních roztoků TAE a TBE pufrů.

1x pufr TAE/TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 9: Složení zásobních roztoků TAE a TBE pufrů

	50x TAE	5x TBE
Tris (Trizma)	242 g	54
0,5 M EDTA	100 ml	20 ml
led. kys. octová	57,1 ml	-
kys. boritá	-	27,5
dH <sub>2</sub> O	voda do 1 L	voda do 1 L

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TAE/TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

### **Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Příprava gelu:

1. Důkladně umyjeme elektroforetická skla (ve vodě a poté je ořeme ethanollem), sestavíme aparaturu do „nalévacího stojáčku“.
2. Ze zásobních roztoků připravíme směs – AC/BIS + voda + gelový pufr + siřičitan, promícháme a přidáme persíran a TEMED, důkladně promícháme, ale vyvarujeme se tvorby bublin v roztoku! a **HNED!!!** nalijeme nebo 5 ml automatickou pipetou nanese mezi sestavená skla; roztok může i velmi rychle „tuhnout“; vložíme hřebínek a necháme min 1 hod. polymerovat.
3. Poté vyjmeme hřebínek, jamky propláchneme elektroforetickým pufrem, nanese vzorky a sestavíme komplet elektroforézy.
4. Nalijeme elektroforetické pufr a probíhá elektroforéza.
5. Po ukončení elektroforézy opatrně oddělíme skla, vyjmeme gel a přeneseme jej do barvicí směsi (200 ml elektroforetického pufru a 20  $\mu$ l roztoku ethidium bromidu); barvení probíhá 10–30 min. a poté jsou fragmenty vizualizované na UV transiluminátoru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25% bromfenolové modři, 40% (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpíjetuje do mikrocetrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 1  $\mu$ l markeru, 10  $\mu$ l vody, 2  $\mu$ l LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 50 V po dobu 30 min. a poté 220 V po dobu 2,5 – 3 hod.

Vizualizace DNA:

- po obarvení je gel položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfoťováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

akrylamid je neurotoxický a kancerogenní, při práci s roztoky a gely je třeba dbát zvýšené opatrnosti a používat ochranné pomůcky! zvláštní opatrnosti je třeba zejména při přípravě zásobních roztoků (práce s rouškou v digestoři)

Tab. 10: Složení nedenaturačního gelu pro elektroforézu DNA.

		<b>nedenaturační gel</b>	
		<b>SEPARAČNÍ GEL (7.5%)</b>	<b>SEPARAČNÍ GEL (10%)</b>
redestilovaná	ml	37,5	31,5
voda	ml	15	20
AC/BIS	ml	7,5	7,5
pufr A nebo A'	μl	160	160
siřičitan sodný	μl	300	300
persíran amonný	μl	30	30
TEMED			
<b>AC/BIS:</b>		30 g acrylamid + 0,8 g BIS / 100 ml	
<b>pufr A:</b>		7,27 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH=7,5 / 100 ml	
<b>pufr A':</b>		36,3 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH=8,8 / 100 ml	
<b>pufr B:</b>		6 g Tris, 48 ml 1 M HCl, pH=6,8 / 100 ml	
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> :</b>		nasycený vodný roztok	
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:</b>		15% roztok	
<b>SDS:</b>		10% roztok	
<b>elektrodotový pufr 1:</b>		9,27 g kys. boritá, NaOH do pH=7,2 / 1000 ml	

AC/BIS	uchovávat ve tmě a chladnu, roztok stálý cca 3 týdny
gelové pufrы	uchovávat ve tmě a chladnu, stálé
persíran	lze uchovávat ve tmě a chladnu 1 týden
elektrodotový pufr 1	připravovat před použitím

Chemikálie:

- akrylamid a bis-akrylamid (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- roztoky pufrů
- nasycený vodný roztok siřičitanu sodného
- persíran amonný
- TEMED
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- jednotka vertikální elektroforézy se zdrojem, sada pro nalévání gelů, sada automatických pipet

*Alternativním postupem pro DNA PAGE je využití čipové elektroforézy Experion (Bio-Rad) s čipy pro elektroforézu DNA. Postup je velmi rychlý, dostatečně citlivý a precizní, nevýhodou je nutnost pořízení nákladné investice.*

### **Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu – denaturační elfo**

Denaturační gel pro elektroforézu DNA se připravuje za přídavku močoviny, používá se k separaci malých fragmentů a pro účely sekvenační elektroforézy.

#### **Příprava a sestavení skel pro sekvenační elektroforézu**

Obě skla, která se používají pro sekvenační elektroforézu, spacers a hřeben důkladně umyjeme detergentem a pečlivě odstraníme případné zbytky gelu. Po osušení skel, spacerů a hřebenu, vše opláchneme v ultračisté vodě a po té ve 100% ethanolu. Spodní sklo (to, na kterém po ELFO zůstává gel) vložíme na 1 hodinu do roztoku bind silane a necháme ho „silanizovat“ tzn. že na skle se vytvoří vrstva, která po té váže gel. Sklo opláchneme ultračistou vodou a potom 100% ethanolem. Na vrchní sklo (to, které odpuzuje gel) nalijeme cca 5 ml repel silane, dobře rozetřeme po skle, tak aby po celé ploše vznikla tenká vrstva a necháme 15 min. působit. Sklo opláchneme ultračistou vodou.

Na spodní „bind“ sklo položíme k dlouhým okrajům spacers a přiložíme vrchní „repel“ sklo tou vrstvou, kterou jsme potřeli repel silane. Soupravu pečlivě urovnáme a spojíme svorkami na jedné z dlouhých a jedné z krátkých stran. Tu stranu, na které není žádná ze svorek důkladně zalepíme přes hranu izolepou, tak aby skla zůstala pevně spojena. Svorky přendáme a postup opakujeme na druhé nezalepené straně. Když jsou obě dlouhé strany zalepené, zalepíme spodní stranu skel. Dbáme na to, aby tato strana byla velmi pečlivě zalepená, jinak gel bude vytékat. Spodní rohy skel zalepíme dvakrát popřípadě třikrát.

Tab. 11: Složení denaturačního gelu pro elektroforézu DNA.

		Koncentrace akrylamidu		
		6%	8%	10%
AC/BIS 30%	ml	20	26,6	33,3
5x TBE	ml	20	20	20
voda	ml	24,7	18,1	11,4
močovina	g	42	42	42

Chemikálie:

10% persíran amonný: 0,1 g do 1 ml vody (připravujeme čerstvý před každou ELFO)

100 ml roztoku připravíme podle tabulky, vše smícháme, zahříváme ve vodní lázni při 55°C (pozor ochlazuje se) po dobu 3 min., objem doplníme do 100 ml. Z takto připraveného roztoku odebereme 10 ml přidáme 60 µl 10% persíranu amonného a 5 µl TEMEDU.

Roztok ihned nanášíme pipetou mezi skla tak, aby nevznikly žádné bubliny. Tato vrstva gelu má po ztuhnutí zabránit vytékání zbývajících gelu.

Když spodní vrstva dobře ztuhne přidáme ke zbývajícím 90 ml roztoku 540 µl 10% persíranu amonného a 45 µl TEMEDU a pomocí stříčky nanese mezi skla, tak aby nevznikly žádné bubliny. Roztok nanášíme až k okraji vyříznutí vrchního skla, přebytečný roztok odstraníme a přesah spodního skla očistíme, aby ne nespálily zbytky gelu. Hřeben zasuneme mezi skla asi 4mm hluboko tou stranou, na které nejsou zuby. Gel necháme ztuhnout.

Trubičku ze stříčky ihned umyjeme, aby v ní gel neztluhl a neucpal ji.

### **Pre-run sekvenační elektroforézy**

Když je gel dobře ztuhlý odstraníme izolepu ze spodní části, skla vložíme do vany a připevníme je k vaně pomocí svorek. Do vany nalijeme 1x TBE pufr a prázdný gel necháme cca 15 – 20 min. běžet při 1800V.

### **Vlastní elektroforéza**

Po pre-run vypneme proud, vyndáme hřeben a do štěrbin, kterou hřeben v gelu vytvořil, nanese loading buffer, po té vsuneme zpátky hřeben tou stranou, na které jsou zuby, tak hluboko, aby hřeben vytvořil mezi skly sloty pro vzorky. Do slotů nanese vzorky (které jsme těsně před tím denaturovali) cca 3 – 4 µl a necháme ELFO běžet při 1800V (cca 1 hodinu). Po doběhnutí ELFO vypneme proud, odpojíme zdroj (!!!) a vyndáme skla. Odstraníme izolepu, vyndáme spacery a opatrně od sebe odlepíme skla. Na spodním „bind“ skle by měl zůstat gel.

### **Barvení stříbrem**

Spodní sklo, na kterém zůstal gel vložíme do fix/stop solution a 20 min. oplachujeme a třepeme. V tomto roztoku může gel zůstat přes noc bez třepání. Gel přeneseme do nové misky a 3krát 5 min. dobře oplachujeme ultračistou vodou za současného třepání. Gel ponoříme do staining solution a 30 min. barvíme a třepeme. Po barvení gel 15 s oplachujeme ultračistou vodou a po té ho vložíme do vychlazené developing solution, ke které jsme přidali 1,5 ml formaldehydu a 200 µl 1% thiosulfátu sodného. 6 – 7 min omýváme, dokud nejsou proužky dobře viditelné. Po zviditelnění proužků přeneseme gel zpět do fix/stop solution a 3 min. necháme působit, aby došlo k ukončení vyvíjecí reakce. Gel 2krát 5 min. omyjeme ve vodě. Gel překryjeme celofánem, necháme uschnout a po té digitalizujeme. Všechny pomůcky důkladně umyjeme.

Chemikálie:

- akrylamid a bis-akrylamid (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- močovina (pro elektroforézu DNA – ultračistá)
- roztoky pufrů

- nasycený vodný roztok siřičitanu sodného
- persíran amoný
- TEMED
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce
- Bind a Repel Silane (Serva)
- Fix/stop solution (10 % kyselina octová): 100 ml kyseliny octové přimícháme do 900 ml ultračisté vody
- Staining solution: 1 l ultračisté vody, 1 g AgNO<sub>3</sub>, 1 ml formaldehydu
- Developing solution (vývojka): 30 g NaCO<sub>3</sub>, 1 l ultračisté vody, těsně před použitím přidáme 1,5 ml formaldehydu a 200 µl 1% thiosulfátu sodného (1% thiosulfát sodný: 0,01 g do 1 ml vody, připravujeme čerstvý před každou ELFO)

Přístroje:

- jednotka vertikální elektroforézy se zdrojem (sekvenační elektroforéza s vysokonapěťovým zdrojem), sada pro nalévání gelů, sada automatických pipet, třepačka

### **Elektroforéza v SYNERGELU**

Synergel je přípravek, který po smíchání s agarózou vytváří gel a výrazně zvyšuje separační možnosti agarozového gelu. Separované fragmenty DNA vytváří ostré pruhy, dobře rozdělené. Je používán zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE gelu je zachována jednoduchost přípravy a provedení gelu a jeho netoxičnost.

Výpočet množství synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci synergelu vypočítáme na základě následujícího vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

kde A je koncentrace agarozového gelu bez přídavku synergelu, který chceme převést na synergel/agarozový gel

0,7 – je hodnota koncentrace základního agarozového gelu

např. v případě, kdy standardní 3% agarozový gel nahražíme gelem s přídavkem synergelu je složení gelu následující:

$$A = 3\%$$

$$\text{množství synergelu ve směsi: } (3 - 0,7) / 2 = 1,15\%$$

1,15% synergelu přidáme k 0,7% agarózy, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g synergelu a 1,75 g agarózy

Postup přípravy Synergel/agarózového gelu:

- Navážíme daná množství agarózy a synergelu.
- Přidáme takové množství 100% ethanolu, aby došlo k rozmíchání (nesmí se tvořit hrudky).
- Přidáme 250 ml 0,5x TBE pufu.
- Rozvaříme v mikrovlnné troubě.
- Přidáme 5 µl roztoku ethidium bromidu.
- Důkladně promícháme.
- Nalijeme do vany / formy na gel.
- Necháme ztuhnout – cca 1–1,5 hod.

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- Synergel (Roth)
- zásobní roztok TBE pufu
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

### ***Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:***

V případě použití barviva SYBR GREEN (nižší toxicita, lepší vizualizace DNA gelu, nižší pozadí) se při přípravě gelu nepoužívá ethidium bromid. Po ukončení PCR je ke vzorkům DNA přidán nanášecí pufr (LB) se SYBR GREEN. Vzorky jsou nanášeny na gel a probíhá elektroforéza. Po ukončení elektroforézy probíhá vizualizace DNA fragmentů/PCR produktů na UV transiluminátoru. V případě dokumentace gelů pomocí kamery nebo fotoaparátu je nutné použití zeleného filtru namísto červeného filtru používaného u gelů barvených ethidium bromidem !

LB se SYBR GREEN:      0,025 g Bromphenol Blue  
                                  0,025 g Xylene Cyanol FF  
                                  3 ml glycerol  
                                  20 µl SYBR GREEN (koncentrovaný roztok, FLUKA)  
                                  doplnit dH<sub>2</sub>O do 10 ml

rozpipetovat do alikvot a skladovat v temnu při -20°C, krátkodobě lze skladovat i při +4°C

## II.5. Metodika analýzy molekulárních dat

### *Digitální obrazová analýza*

Vyhodnocování získaných elektroforeogramů:

Pro vyhodnocování výsledků po elektroforéze je používána řada metod. Mezi jednodušší metody vhodné při malém množství analyzovaných vzorků a/nebo malém počtu proužků je ruční proměření gelů a stanovení relativní pohyblivosti jednotlivých pruhů nebo jejich velikosti (délky udané v bp).

Poměrně dokonalých výsledků lze dosáhnout po důkladnější (ale značně časově náročné) obrazové analýze gelů. Jsou dostupné komerčně dodávané záznamové jednotky (scanery, příp. zařízení na bázi CCD kamery, s obslužným a vyhodnocovacím softwarem – BioRad, Image Laboratory, Stratagene), ale výsledků obdobné kvality lze dosáhnout i s méně finančně náročným zařízením.

Na našem pracovišti využíváme komplexní počítačové zpracování gelů – při využití barevného stolního scanneru s vysokou rozlišovací schopností (600 dpi) nebo digitální fotoaparátu jako součásti GelDocumentation System. Po digitalizaci jsou gely zpracovány pomocí speciálního software – GelManager® for Windows (BioSystematica, U.K.), BioProfil 1D++ (Vilber Lourmat, Francie) nebo UltraQuant 6.0 (UltraLum, INC, USA).

Tyto programy pro digitální obrazovou analýzu a zpracování elektroforetických gelů umožní analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňují konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány. Využití mají zejména v epidemiologických studiích, identifikaci genotypů, systematice, ekologii, populační genetice, klinické biochemii a biotechnologických aplikacích.

Postup obrazové analýzy gelů:

Následující kroky představují kostru postupu počítačového zpracování a vyhodnocování elektroforeogramů

- záznam gelu ze scanneru nebo digitálního fotoaparátu/kamery
- úprava a optimalizace "obrázku" – záznamu gelu
- výběr pozice vzorku a záznam křivky optické hustoty vzorku
- odstranění pozadí
- korekce absorbančních profilů na základě referenčních spekter
- kontrola a korekce pozice pík (proužků)
- porovnání profilů (korelací profilů nebo porovnáním pozice proužků)
- výpočet matice podobnosti (koeficienty podobnosti)
- výpočet a grafické znázornění pomocí dendrogramu
- identifikace nového paternu porovnáním s databází



### Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení molekulárních markerů je vhodné využít statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představuje prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu je možné sestavit matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení (výpočet frekvence alel, výpočet koeficientů genetické identity, výpočty genetických vzdáleností či podobností, clusterová /UPGMA – unweighted pair group method averages/ a ordinační /PCO – Principal Coordinates Analysis/ analýza a sestavení dendrogramů a ordinačních diagramů). Pro tyto účely je využíván program Statistica 6.0 (Statsoft) a MVSP (Kovach Comp. Serv.) (z důvodu možnosti výpočtu genetické distance dle Nei-Li metriky koeficientů podobnosti).

### III. Srovnání novosti postupů

Předkládanou „Metodiku izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) lze hodnotit jako novou metodiku, protože v současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zahrnující optimalizované pracovní postupy pro izolaci DNA a analýzu molekulárních markerů u brambor. Dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích, které se problematikou molekulárního markerování zabývají. Komplexní vyhodnocení vhodnosti jednotlivých postupů izolace DNA a použitelnosti jednotlivých markerů pak dostupné není. Molekulární markery představují ve srovnání s morfologickými či biochemickými markery kvalitativně nový přístup, který má na jedné straně obrovský potenciál využití, na straně druhé pak má i své limity. Pro nekontroverzní použití molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd včetně hodnocení odrůdové čistoty a pravosti je naprosto nezbytné použít vhodné postupy izolace DNA, které poskytují kvalitní DNA použitelnou pro opakovatelné a reprodukovatelné analýzy. Rovněž v oblasti vývoje a použití jednotlivých markerů dochází k vývoji a značnému posunu a každý z markerovacích systémů má svá specifika. Reálná interpretace molekulárních dat pak vyžaduje volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Přednosti a limity jednotlivých postupů pro izolaci DNA a analýzu molekulárních markerů jsou předmětem předkládané metodiky.

#### IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) obsahuje optimalizované postupy pro izolaci DNA. V metodice je uveden nejen přehled metod, ale je poukázáno i na přednosti jednotlivých metod a metody jsou vyhodnoceny z pohledu rychlosti a pracnosti provedení, kvantity a kvality získané DNA. Ve druhé části jsou pak představeny základní fingerprintové techniky a metody určené pro separaci a vyhodnocení molekulárních markerů.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů u brambor. Výstupem analýzy je pak spektrum markerů, respektive soubor markerů při použití více markerovacích systémů. Molekulární markery pak mohou být využity pro popis a identifikaci odrůd brambor, hodnocení odrůdové čistoty a pravosti, popis a charakterizaci genových zdrojů. Molekulární markery nejsou dosud standardně pro tyto účely používány, mohou být ale vhodným doplňkem morfologických a biochemických markerů. Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a šlechtitelská, pracoviště kontrolních orgánů, která mohou s výhodou využít přednosti analýzy molekulárních markerů – rychlost analýzy, vysokou míru polymorfismu a nízké ovlivnění faktory vnitřního a vnějšího prostředí. Metodika bude uplatněna prostřednictvím Ústředního bramborařského svazu, který sdružuje pěstitele a zpracovatele brambor a obchodní organizace v ČR. S Ústředním bramborařským svazem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## V. Seznam použité související literatury

- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hiller, J., Veilleux, E. (2001). Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44, 50-62.
- Ballvora, A., Hesselbach, J., Niewohner, J., Leister, D., Salamini, F., Gebhardt, C. (1995). Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 82-90.
- Becker, J., Heun, M. (1995). Rarely microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* 27, 835-845.
- Bonfini L., Heinze, P., Kay S a Van den Eede G. (2001): Review of GMO detection and quantification techniques, European Commission, Joint Research Centre, Ispra, Italy
- Borokov, A.Y. 1997. Role of the leader intron in regulation of the expression of the potato sucrose synthase gene. *Plant Physiol.* 114 (Suppl.), 64-71.
- Callow, J.A., Foed-Lloyd, B.V., Newbury, H.J. (1997). *Plant genetic resource—conservation and use.* (Wallingford CAB, UK).
- Cooke, R.J., Reeves, J.C. (1998). New approaches to potato variety identification. *Potato Res.* 42, 529-539.
- Coombs, J.J., Frank, L.M., Douches, D.S. (2004). An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. *Am. J. Potato Res.* 81, 243-250.
- Covey, S. N. a Hull, R. (1981). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA. Detection of transcripts, properties and location of the gene encoding the virus inclusion body protein. *Virology* 111, 463-474.
- Čurn V. et al. (2005). Molekulární markery – protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Demeke, T., Kawchuk, L.M., Lynch, D.R. (1993). Identification of potato cultivars and clonal variants by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Am. Pot. J.* 70, 561-569.
- Demeke, T., Lynch, D.R., Kawchuk, L.M., Kozub, G.C., Armstrong, J.D. (1996). Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Cell Rep.* 15, 662-667.
- Desborough, S., Peloquin, S.J. (1968) Potato variety identification by use of electrophoretic parents of tuber proteins and enzymes. *Am. Pot. J.* 45, 220-229.
- Edwards, K., Jihstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19, 1349.
- Ehlers, B., Strauh, E., Goltz, M., Kubsch, H., Wagner, H., Maidhof, J., Bendiek, B., Buhk, H.J. (1997): Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 4, 118-121.
- Fischer, P.J., Gardner, R.C., Richardson, T.E. (1996). Single locus microsatellite isolation using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 4369-4371.
- Ford, R., Taylor, P.W.J. (1997). The application of RAPD markers for potato cultivar identification. *Aust. J. Agr. Res.* 48, 1213-1217.

- Gavrilenko, T. A., Dorokhov, D. B., Nikulenkova T. V. (1999). Characterization (phenotypic and molecular–RAPD analysis) of intergeneric somatic hybrids between tomato *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous potato species of the *Etuberosa* series. Russian J. Genet. 30, 1605-1615.
- Ghislain, M., Rodríguez, F., Villamón, F., Núñez, J., Waugh, R., Bonierbale, M. (2000). Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. Research on Potato, CIP Program Report 1999–2000, pp. 167-174.
- Görg, R., Schachtschabel, U., Ritter, E., Salamini, F., Gebhardt, C. (1992). Discrimination among 136 tetraploid potato variety by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. Crop Sci. 32, 815-819.
- Hantula, J., Dusabenygasani, M., Hamelin, R.C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur. J. Path. 26, 159-166.
- Hemmer, W. (1997). Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS Report 2/1997, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland.
- Holst-Jensen, A., Holck, A., Lillehaug, D., Løvseth, A., Berdal, K.G., Knutsen, A.K., Shahbaz, S. (2001). Development of analytical methods and detection of genetically modified maize- and soyadervived materials in selected foods on the Norwegian market in the year 2000. Joint report from the National Veterinary Institute (Veterinærinstituttet) and the Norwegian Food Control Authority (Statens næringsmiddeltilsyn, SNT).
- Hosaka, K., Mori, M., Ogawa, K. (1994). Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. Am. Pot. J. 71, 535-546.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.H. (1997). Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 205, 442-445.
- Chakrabarti, S.K., Birham, R.K., Pattanayak, D. (1998). Identification and genetic similarity analysis of Indian potato cultivar by random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Indian J. Exp. Biol. 37, 1123-1128.
- Chakrabarti, S.K., Pattanayak, D., Naik, P.S. (2001). Fingerprinting Indian potato cultivars by random amplifies polymorphic DNA (RAPD) markers. Potato Res. 44, 375-387.
- Chakrabarti, S.K., Pattanayak, D., Sarmat, D., Chimote, V.P., Naik, P.S. (2006). Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. Biol. Plantarum 50, 531-536.
- Charters, Y.M., Robertson, A., Wilkinson, M.J., Ramsay, G. (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Olifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor. Appl. Genet. 92, 442-447.
- Jobes, D.V., Hurley, D.L., Thien, L.B. (1995). Plant DNA isolation: method to efficiently remove polyphenolic, polysaccharides, and RNA. Taxon 44, 379-386.
- Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L., Zehr, B.E. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1, 365-337.

- Kawchuk, L.M., Lunch, D.R., Thomas, J., Penner, B., Sillito, D., Kulcsar, F. (1996). Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Am. Pot. J.* 73, 325-335.
- Kim HS, Ward RW (1997) Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. *Theko.*) based on RFLPs and coefficient of paternage. *Theor. Appl. Genet.* 94, 472-479.
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hubner, P. (1997). Sensitive method for the detection of the genetically engineered soybean Roundup Ready. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 88, 164-175.
- McGregor, C.E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., Warnich, L. (2000). A komparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113, 135-144.
- Meksem, K., Leister, D., Peleman, J., Zabeau, M., Salamini, F., Gebhardt, C. (1995). A high resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 249, 74-81.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3, 175-182.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 19, 4321-4326.
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kubátová, B., Čurn, V (2008). Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (submitted).
- Organisyan, A.S., Kochieva, E.Z., Ryskov, A.P. (1996). Fingerprinting potato species and cultivars by the RAPD-PCR method. *Genetika* 32, 448-451.
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E. (1991). DNA markers in plant improvement. *Adv. Argon.* 46, 39-90.
- Pattanayak, D., Chakrabarti, S.K., Naik, P.S. (2002). Genetic diversity of late blight resistant and susceptible Indian potato cultivars revealed by RAPD markers. *Euphytica* 128, 183-189.
- Paz, M.N., Veilleux, R.E. (1997). Genetic diversity based od Radomily amplified polymorphic DNA (RAPD) and its relationship with the performance of diploid potato hybrids, *Journal of the American society for horticultural science* 122, 740-747.
- Pietsche K., Waiblinger H.U., Brodmann P., Wurz A. (1997). Screeningverfahren zur identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensm. Rundsch.* 93, 35-38.
- Pieterse, L., Hils, U. (2007) *World Catalogue of Potato Varieties 2007*. Clenze, Agrimedia GmbH, Germany, 253pp.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato kultivar. *Theor. Appl. Genet.* 98, 107-112.
- Provan, J., Powell, W., Waugh, R. (1996). Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 92, 1078-1084.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and

- restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Schneider, K., Douches, D.S. (1997). Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *Am. Potato J.* 74, 149-160.
- Singsit, C., Ozais-Akins, P. (1993). Genetic variation in monoploids of diploid potatoes and detection of clonespecific random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Cell Rep.* 12, 144-148.
- Sobotka, R., Dolanská, L., Čurn, V., Ovesná, J. (2004). Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *J. Appl. Genet.* 45, 161-173.
- Sosinski, B., Douches, D.S. (1996). Using polymerase Chain reaction based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivar. *Hort. Sci.* 31, 130-133.
- Souček, J. (1997). Ochrana odrůd brambor v ČR a uplatňování licenčních poplatků při prodeji certifikované sadby brambor. *Bramborářství*, 1997, 6.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *Hort. Sci.* 31, 729-741.
- Sýkorová, S. (1999). Identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) pomocí elektroforézy proteinů a enzymů. *Rostl. Výroba*, 45, 193-196.
- Van der Voort, J.K., Van Eck, H.J., Draaistra, J., van Zandvoort, P.M. (1998). An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol. Breed.* 4, 73-77.
- Van Eck, H.J., Van der Voort, J.K., Draaistra, J., van Zandvoort, P., van Enckevort, E., Segers, B., Peleman, J., Jacobsen, E., Helder, J., Bakker, J. (1995). The inheritance and chromosomal localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breed.* 1, 397-410.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Homes, M., Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zebeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- Waugh, R., Baier, E., Powell, W. (1992). The use of RAPD markers for the detection of gene introgressing in potato, *Plant Cell Rep.* 11, 466-469.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1992). Genetics analysis using RAPD markers. *Method Enzymol.* 260, 335-348.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Zietkiewics, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.
- Zimmermann, A., Lüthy, J., Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soybean food samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 207, 81-90.
- UKZUZ (2008). Přehled odrůd brambor. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně, Národní odrůdový úřad, Brno, 127 pp.

## VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

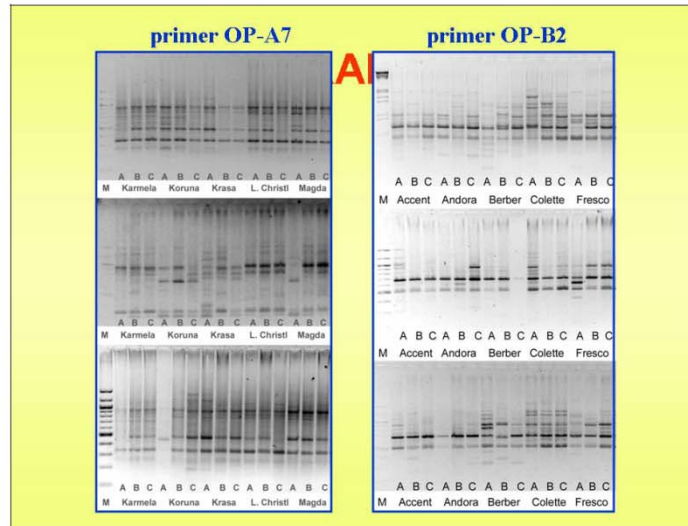
- Čurn V. (2005).** Molekulární markery – protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Čurn V., Kubátová B., Vávřová P., Suchá O., Čížková H. (2007).** Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis*: Comparison of populations in two man-made lakes of different age and history. *Aquatic Botany* 86, 321-330.
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2007).** Wild potato species: characterization and biological potential for potato breeding. *Czech J. Genet. Plant. Breed.* 43, 73-81.
- Kubátová B., Čurn V. (2005).** Soubor metodik a laboratorních protokolů. BC ZF JU a Laboratoř molekulární biologie rostlin KB BF JU, Č. Budějovice.
- Nováková A., Čurn V. (2008).** Molecular markers in potato variety identification. *Potato Res.* (submitted).
- Nováková A., Čurn V., Bárta J., Heřmanová V. (2006).** Využití technik SSR a ISSR pro identifikaci odrůd brambor. *Agroregion 2006, Sbor. VI. mezinár. věd. konf., České Budějovice 24.-25.8.2006, JU v Č. Budějovicích*, pp. 97-102.
- Nováková A., Čurn V., Bárta J., Šimáčková K., Heřmanová V. (2006).** SSR, ISSR and retrotransposon based markers and its application to potato variety identification. *EAPR-EUCARPIA The Science of Selection. Potato Breeding Methodology for the 21st Century, Carlow, Ireland, 20th-22nd November 2006*, p. 47.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2006).** Molecular markers as a tool for potato varieties identification. *5th Plant Genomics European Meetings, Venice, Italy, 11-14 October 2006*, p. 215.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** Detection of GMO potatoes based on PCR. *6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007*, p. 811.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** PCR based detection of GMO potatoes. *7th int. Symp. Recent Advances in Plant Biotechnology, Plant Biotechnology: Impact on High Quality Plant Production, Stará Lesná, June 10-16, 2007, Slovak Rep.*, p. 68.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** Potato variety identification by molecular markers. *6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007*, p. 812.



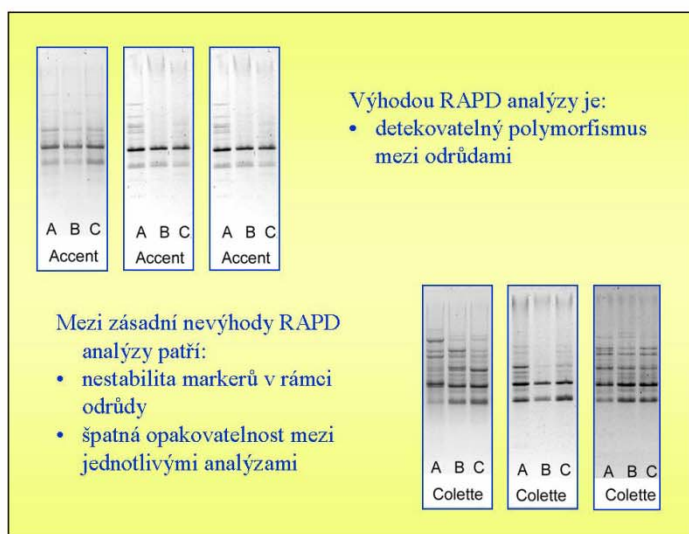
- Nováková A., Šimáčková K., Kubátová B., Čurn V. (2008).** Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (*submitted*).
- Sáková L., Čurn V., Sobotka R. (2000).** Comparison of different DNA isolation methods for RAPD, AFLP and PCR-RFLP analyses. *Coll. Sci. Papers, Fac. Agric. České Budějovice, Ser. Crop Sci.* 17, 83-91.
- Suchá O., Vávřová P., Čížková H., Čurn V., Kubátová B. (2007).** Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis*: II. A comparative study of clones originating from two populations of different age. *Aquatic Botany* 86, 361-368.

## VII. Příklady výstupů analýzy molekulárních markerů

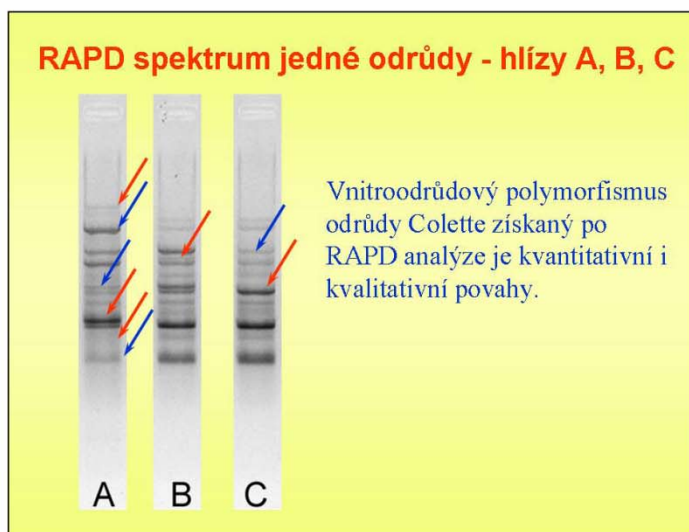
### Ukázka výsledků RAPD analýzy u brambor



**Obr. 1:** Spektrum RAPD markerů získané po amplifikaci s primerem OPA-07 a primerem OPB-02. DNA byla izolovaná pomocí CTAB metody z hlíz, pro každou odrůdu jsou uvedeny výsledky 3 opakování – izolace ze 3 hlíz dané odrůdy. U řady odrůd je patrná nestabilita RAPD spekter a nestejně výsledky získané v rámci třech hodnocených opakování.

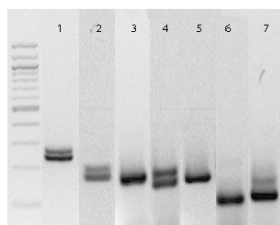


**Obr. 2:** Na tomto obrázku jsou uvedeny výsledky opakovaných analýz – RAPD analýzy u třech hlíz dané odrůdy, která byla třikrát nezávisle opakována. Jsou patrné nejen rozdíly mezi analyzovanými hlízami, ale i nestabilita při porovnání opakovaných analýz. Na základě zjištěných výsledků, nestability a obtížné opakovatelnosti RAPD analýzy bylo doporučeno tuto techniku nepoužívat u brambor pro účely hodnocení genových zdrojů a identifikace odrůd.

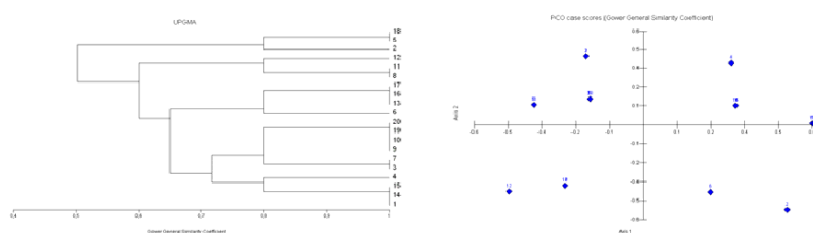


**Obr. 3:** Ukázka detekovaného kvalitativního i kvantitativního polymorfismu při hodnocení třech hlíz u odrůdy Colette.

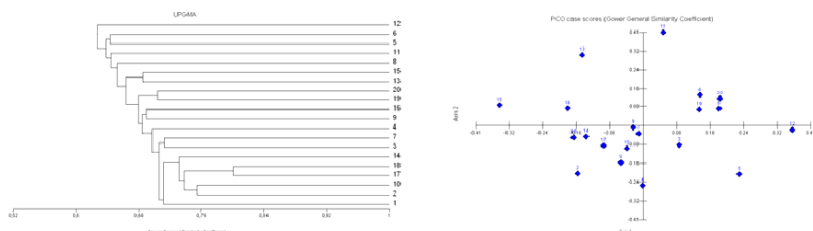
### Ukázka výsledků analýzy mikrosatelitů u brambor



**Obr. 4:** Spektrum SSR markerů získaných po amplifikaci s primerem STWIN 12G.



**Obr. 5:** Výsledky statistické analýzy mikrosatelitových dat – A/ dendrogram získaný po shlukové analýze (UPGMA) a B/ ordinační diagram získaný po PCO analýze (Principal Coordinates Analysis). Na výsledcích je patrné seskupení odrůd do skupin, odlišitelnost jednotlivých skupin odrůd je velmi dobrá a zřetelná. Pro rozlišení a jednoznačnou identifikaci všech odrůd je zapotřebí používat více (5) mikrosatelitových markerů/lokusů.



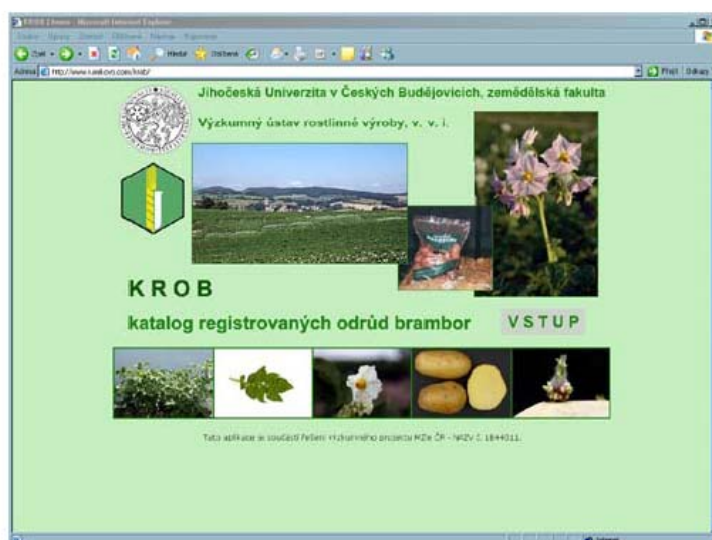
**Obr. 6:** Výsledky statistického zpracování ISSR dat – je patrný vyšší polymorfismus daného markeru a vyšší rozlišovací schopnost, kdy všechny sledované odrůdy byly s dostatečnou mírou přesnosti odlišeny. Nevýhodou daného markeru je ale obdobně jako u RAPD jeho nestabilita, zjištěná jak v rámci opakování analýz u jednotlivých hlíz, tak i během nezávislého opakování amplifikace.

## VIII. Katalog morfometrických, bílkovinných a DNA markerů

Metody vypracované v rámci této metodiky – tj. metody izolace DNA a metody analýzy jednotlivých DNA markerů byly využity pro tvorbu "Katalogu morfometrických, bílkovinných a DNA markerů". Tento katalog je dostupný na internetu na adrese: <http://www.katalogbrambor.cz>. Katalog zahrnuje celé spektrum v ČR registrovaných odrůd brambor, obsahuje jejich popisy, spektra bílkovinných a molekulárních markerů- katalog pak umožňuje (1) vyhledání příslušné odrůdy a podává popisnou informaci o jejích charakteristikách na úrovni morfometrických, biochemických a molekulárních markerů; (2) identifikaci odrůdy na základě zadání zjištěných parametrů odrůdy.

Součástí katalogu je elektronická vyhledávací databáze KROB (Katalog registrovaných odrůd brambor). Získaná data – morfologické charakteristiky, spektra biochemických markerů a spektra DNA markerů byla po analýzách zaznamenána, zpracována prostřednictvím obrazové analýzy a převedena do „nula-jedna“ matic charakterizující nepřítomnost či přítomnost pruhu produktu (pruhu) v elektroforetickém spektru příslušného markeru. Získaná data jsou vložena do elektronické vyhledávací databáze. Katalog společně s databází je výstupem využitelným šlechtiteli, kontrolními orgány a dostupný odborné veřejnosti.

Ukázky stránek elektronické vyhledávací databáze KROB.



Čum V. a kol. (2008): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.).

KATALOG ODRŮD BRAMBOR REGISTRovaných V ČR  
(Vyhledání databáze charakteristických odrůd brambor podle výtvarných, morfometrických znaků, biochemických profilů a markerů na úrovni DNA)

O KATALOGU SEZNAM ODRŮD VYHLEDAT ODRŮDU V KATALOGU PŘIDAT ODRŮDU DO KATALOGU ADMINISTRACE

Č.	Odrůda	Rodičovská kombinace	Udržovatel	Zastoupení v ČR	Skupina ranosti	Užitkový směr	Rok registrace v ČR	Právní ochrana
13	Adora	ccc x vvv	HZPC Holland B.V., Joure, NL	Oseva PRO, s.r.o., Praha	velmi raná	konzumní	1996	-
84	Albatros	Nanka - Nanking Kartoffel - wml - Vermehrungs	GmbH, Smol Lucivitz, D	NORSKA CZ s.r.o., Havlíčkův Brod	poloraná	smážené výrobky, výroba šrobu	2004	CPG
192	ALÉNA							
128	Amelia		Europlant Pflanzenzucht GmbH, Lunenburg, D	Europlant - Bechtobelská spol. s r.o., Praha	polopozdní pozdní	výroba šrobu	2005	CPG
15	Amica		HZPC Holland B.V., Joure, NL	Oseva PRO, s.r.o., Praha	velmi raná	konzumní	2005	CPG
129	Amica		Selekta Pacov, a.s., Pacov		polopozdní pozdní	výroba šrobu	1994	PO
130	Amidon		Selekta Pacov, a.s., Pacov		polopozdní pozdní	výroba šrobu	2003	PO
85	Andante		SAKA-RADIS Pflanzenzucht GbR, Hamburg, D	MEDIRO AGRAS H.B., spol. s r.o., Havlíčkův Brod	poloraná	konzumní	2006	CPG
34	Asota		Vesta Velhartice, a.s., Kollnec		raná	konzumní	2003	PO
16	Asotia		Europlant Pflanzenzucht GmbH, Lunenburg, D	Europlant - Bechtobelská spol. s r.o., Praha	velmi raná	konzumní	2003	CPG
35	Asotieffe		HZPC Holland B.V., Joure, NL	MEDIRO AGRAS H.B., spol. s r.o., Havlíčkův Brod	raná	konzumní	2005	CPG
121	Astoria		Výrobná Velhartice, a.s., Velhartice		polopozdní pozdní	smážené lupinky	2000	PO
36	Atalia		Selekta Pacov, a.s., Pacov		raná	výroba šrobu	2005	PO
17	Atelia		Agrico B.A., Emmeloord, NL	Agrico Bohemia s.r.o., Tábor	velmi raná	konzumní	2005	CPG
37	Atilla		SAKA-RADIS Pflanzenzucht GbR, Hamburg, D	MEDIRO AGRAS H.B., spol. s r.o., Havlíčkův Brod	raná	konzumní	1995	PO

KATALOG ODRŮD BRAMBOR REGISTRovaných V ČR  
(Vyhledání databáze charakteristických odrůd brambor podle výtvarných, morfometrických znaků, biochemických profilů a markerů na úrovni DNA)

O KATALOGU SEZNAM ODRŮD VYHLEDAT ODRŮDU V KATALOGU PŘIDAT ODRŮDU DO KATALOGU ADMINISTRACE

Přehled odrůdy: Adora

Rodičovská kombinace: ccc x vvv  
Udržovatel: HZPC Holland B.V., Joure, NL  
Zastoupení v ČR: Oseva PRO, s.r.o., Praha  
Skupina ranosti: velmi raná  
Užitkový směr: konzumní  
Rok registrace v ČR: 1996  
Právní ochrana:

DNA markery:  
STM1052: 101  
STG855: 01  
STW120: 0103  
STM1102: 01  
STMW120: 11  
STM3015: 011  
STM2005: 011

Foto profilu DNA:

Název: Čurn V. a kol. (2008): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.).

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Alena Nováková  
Ing. Kateřina Šimáčková  
Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 12.12.2008 (č.j. 46688/08-18020), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [VCurn@seznam.cz](mailto:VCurn@seznam.cz)

ISBN: 978-80-7394-135-2

**7.5. Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.) / Methodology of DNA isolation and GMOs detection in potato (*Solanum tuberosum* L.)**

**V. Čurn, A. Nováková, K. Šimáčková**





Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta



BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM  
JU ZF ČESKÉ BUDĚJOVICE

## Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV 1B44011: „Vývoj a testování systému analytických metod pro praktickou charakterizaci odrůd brambor registrovaných v ČR“



Autoři: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Alena Nováková,  
Ing. Kateřina Šimáčková

České Budějovice, Září 2008

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta**

**Metodika izolace DNA a detekce GMO  
u brambor (*Solanum tuberosum* L.)**

**Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV 1B44011: „Vývoj a testování systému analytických metod pro praktickou charakterizaci odrůd brambor registrovaných v ČR“**

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Alena Nováková  
Ing. Kateřina Šimáčková**

**České Budějovice, Září 2008**

Obsah:

<b>I. Cíl metodiky</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>2</b>
II.1. Úvod.....	2
II.2. Metodika izolace DNA.....	3
Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA brambor.....	3
Izolace DNA pomocí CTAB-PVP.....	4
II.3. Metodika detekce GMO.....	7
Multiplex PCR.....	7
qRT-PCR.....	9
II.4. Metodika elektroforézy DNA.....	11
Elektroforéza v agarózovém gelu.....	11
Elektroforéza v SYNERGELu.....	13
Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:.....	14
<b>III. Srovnání novosti postupů</b> .....	<b>15</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>16</b>
<b>V. Seznam použité související literatury</b> .....	<b>17</b>
<b>VI. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>19</b>
<b>VII. Příklady výstupů detekce a kvantifikace GMO u brambor</b> .....	<b>21</b>

## I. Cíl metodiky

V posledním desetiletí dochází ve světě ke stálému navyšování ploch geneticky modifikovaných plodin (GMP). Většinu pěstebních ploch zaujímají čtyři hlavní plodiny: sója, kukuřice, bavlník a řepka olejná. Techniky genových manipulací jsou ale dobře zavedeny i u bramboru a brambor je jednou z plodin, které patří k tzv. „Biotech Crops“. Ve světě jsou transgenní (geneticky modifikované - GM) brambory pěstované již od roku 1996, kdy začalo komerční pěstování transgenních plodin. V České republice lze pěstovat pouze geneticky modifikované plodiny (GMP), které byly uvolněny do oběhu na základě evropských předpisů postihujících proces schvalování nových GM organismů. Pro běžné komerční využití lze pěstovat pouze GM odrůdy polních plodin zapsané ve Státní odrůdové knize (úřední seznam odrůd rostlin, které jsou v ČR zaregistrovány) nebo ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin, popř. zeleniny (seznam odrůd rostlin, sestavený příslušným orgánem ES na základě národních seznamů odrůd členských států). Na národní úrovni nejsou k současnemu datu ve Státní odrůdové knize zapsány žádné odrůdy GM plodin. Na úrovni evropské Společný katalog odrůd druhů zemědělských rostlin již ale obsahuje transgenní (geneticky modifikované) odrůdy. Tato skutečnost vyústila v potřebu vypracování metodiky pro rychlou a spolehlivou detekci GM brambor. Předkládaná metodika zahrnuje postupy izolace DNA z listů i hlíz a metody detekce a kvantifikace přítomnosti záměrně vnesené cizorodé DNA - transgenu - u brambor. Vypracování a optimalizace postupů pro detekci transgenu umožní monitoring GM brambor na všech úrovních pěstování, skladování a manipulace s rostlinným materiálem.

## II. Vlastní popis metodiky

### II.1. Úvod

Kulturní brambor, *Solanum tuberosum* L., je jednou ze čtyř nejvýznamnějších plodin světa spolu s pšenicí, rýží a kukuřicí a využívá se jak ve výživě lidí, tak i ve výživě hospodářských zvířat. Významné je i jeho využití pro účely průmyslového zpracování.

Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou žijící organismy, jejichž genetická informace byla změněna pomocí technik genové manipulace, tzv. technik rekombinantní DNA. Touto genetickou manipulací je obvykle vnesení sekvence cizorodé DNA (insertu) do recipientního modifikovaného organismu. Tento proces se nazývá transformace (Holst-Jensen, 2001).

Detekce GMO je uskutečňována pomocí polymerázové řetězové reakce (z angl. polymerase chain reaction – PCR) a to především na úrovni DNA nebo pomocí imunologických metod jako je například ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), na úrovni proteinu (Bonfini a kol, 2001). DNA je relativně stabilní molekula a proto je preferovaným materiálem pro většinu analýz. Nespornou výhodou analýz založených na PCR je potřeba malého množství výchozího materiálu potřebného pro izolaci DNA a to v rozmezí 100 mg (Pietsche a kol., 1997, Waiblinger a kol. 1997) – 350 mg (Zimmermann a kol., 1998). Pro rutinní skríníng mohou být použity primery (krátké úseky komplementární DNA) odvozené od charakteristických sekvencí jako je 35S promotor viru mozaiky kvěťáku (P-35S) a nos (nos3') terminátor bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, které se běžně vyskytují u mnoha GMO plodin dostupných na trhu (Hemmer, 1997), či primery odvozené ze sekvencí DNA dalších vnesených genů. První GMO screeningové metody byly použity německými a švýcarskými vědci (Pietsche a kol., 1997) a byly založeny na detekci přítomnosti sekvencí P-35S a nos3' a následné separaci PCR amplifikované DNA pomocí gelové elektroforézy (Meyer, 1999; Pietsche a kol., 1997). Určitou nevýhodou PCR reakce představuje možnost nespecifické vazby mezi primerem a templátem DNA. Proto Hupfer a kol. (1997) zvolil pro detekci přítomnosti cizorodé DNA metodu Southern blotu, založenou na hybridizaci DNA na membráně se specifickou, značenou, sondou. Jednou z modifikací standardní PCR, zvyšující dále její specifitu či přesnost, je metoda tzv. „nested PCR“ (Meyer a Jaccoud, 1997; Köppel a kol., 1997). Nejspolehlivější metodou ověření autenticity produktu PCR je jeho sekvenování, ale tento postup se rutinně nepoužívá (Ehlers a kol., 1997; Hupfer a kol., 1997).

## II.2. Metodika izolace DNA

### ***Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA brambor***

DNA izolujeme dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu (odebraného v laboratoři nebo v polních podmínkách a uchovávaného do doby izolace na ledu po dobu 2–4 hod) nebo z materiálu zamraženého (po odebrání materiál zamrazíme v tekutém dusíku a uchovááme při teplotě -80°C). V případě izolace DNA z hlíz je možné využít i lyofilizovaného materiálu (z hlízy ukrojíme tenký plátek z celého profilu hlízy, tento plátek zamrazíme při -80°C a následně lyofilizujeme. Po lyofilizaci plátek homogenizujeme a získaný prášek uchovááme při teplotě -20°C).

- hlízová šťáva

Hlízovou šťávu získáváme dle metodiky UPOV (UPOV 2002) z hlíz, které omyjeme, zmrazíme při -20°C a po jejich rozmražení z nich vymačkáme hlízovou šťávu. Z takto získané hlízové šťávy izolujeme DNA dle příslušného protokolu.

- lyofilizovaný materiál

Jedná se o materiál, který získáváme ze všech předchozích typů vzorků (pravé listy, hlízy, hlízová šťáva) po jejich lyofilizaci (šetrné vysušení při nízké teplotě ve vakuu). Lyofilizovaný materiál uchovááme v uzavřených mikrocentrifugačních zkumavkách v mrazáku při -20°C.

### ***Izolace templátové DNA z hlíz a listů pro účely PCR analýzy***

Pro izolaci DNA lze použít celou škálu metod. Ne všechny ale poskytují vhodný DNA templát (z pohledu kvality a kvantity) a ne všechny techniky jsou vhodné pro izolaci DNA ze zelených částí rostliny a hlíz. Na základě rozsáhlého skríningu a optimalizací extrakčních technik, provedených v laboratoři Biotechnologického centra JU ZF České Budějovice, byla jako nejvhodnější metoda izolace DNA zvolena technika CTAB-PVP. Izolace DNA byla provedena pomocí pufru cetyltrimetylamoniumbromidu (CTAB), dle modifikovaného protokolu podle Williamse a Rogerse (Nováková et al., 2008). Modifikace spočívala v přidavku PVP (polyvinylpyrrolidon 40000) k extrakčnímu CTAB pufru. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 100 µl sterilní H<sub>2</sub>O a byla uchováána při -20°C.

### ***Izolace DNA pomocí CTAB-PVP***

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analýzy. Přidáním PVP lze dosáhnout účinnějšího odstranění kontaminujících látek a tím i získu dostatečně čisté a kvalitní DNA.

Metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA lze tyto složky komplexu od sebe oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 µl roztoku. Připravený pufr předehřejeme na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
  - V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 µl předehřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrům. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme. Poté vzorky stočíme na centrifuze (centrifugujeme) při 12000 rpm po dobu 10 min.
4. Po centrifugaci převedeme supernatant (500 µl) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 500 µl chloroformu s IAA. Směs 10 min. promícháváme a následně centrifugujeme 5 min. při 12000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5% CTAB a směs promícháme. Znovu přidáme 500 µl směsi chloroformu–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 µl) a 2–3x lehce promícháme převrácením. Poté ponecháme cca 30 min. (popř. přes noc) v mrazáku (při -20°C). Následně centrifugujeme 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 300 µl 1x TE (Tris – EDTA) a 30–60 min. inkubujeme při 37°C.
8. Přidáme 2 objemy (600 µl) ledového (-20°C) 100% ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Vzorky ponecháme minimálně 20 min., maximálně pak 12 hodin (větší výtěžnost DNA) v mrazáku (-20°C).
9. Vzorky vyjmeme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.

10. Přidáme 1 ml ledového (-20°C) 70% ethanolu, 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Ihned odstraníme všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 µl 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpustit 40 min. při 37°C).

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 µl Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol, nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkptoetanol, 1% PVP–40000)
- 2-merkptoetanol
- 5% CTAB
- chloroform–IAA (isoamylalkohol) (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací vyhřívaný blok (dry-blok), termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř



## II.3. Metodika detekce GMO

### *Multiplex PCR*

Metodika – stávající doporučené metodiky pro detekci transgenů u brambor (Validation Report EH92-527-1 potato) se ukázaly jako ne zcela vyhovující (detekce pomocí RT-PCR, detekce jiných transgenů než jaký byl k dispozici, použití fluorescenčně značených primerů a specifických sond). Z tohoto důvodu byla vypracována originální metodika detekce transgenů v geneticky modifikované odrůdě Desiree za využití tzv. multiplexové PCR, s použitím dvou sad primerů. Jeden primerový pár (GNA\_1/ GNA\_2) byl navržen pro amplifikaci úseku 140 bp transgenů pro lektin sněženky (GNA- Galantus nivalis aglutinin) a druhý primerový pár (UGP-af7/ UGP-ar8) byl navržen jako „interní standard“ pro amplifikaci 88 bp úseku genu UDP-glucose pyrophosphorylase (Borokov et al. 1997). Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.1.

Tab. 1: Sekvence primerů použitých pro multiplex PCR

Primer	Sekvence
UGP-af7	5'- GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC – 3'
UGP-ar8	5'- CCT ACC TCT ACC CCT CCG C – 3'
GNA_1	5'- ATG GCT AAG GCA GTC TCC TC – 3'
GNA_2	5'- TCA TTA CTT TGC CGT CAC AAG – 3'

Navržený metodický postup umožňuje specifickou detekci přítomnosti transgenů v DNA obsažené v hlízách i v listech brambor. U GM brambor jsou při multiplexové PCR získány 2 produkty – amplifikovaný úsek odpovídající detekovanému transgenů GNA a amplifikovaný úsek genu UDP signalizující „správný“ průběh PCR reakce. U netransgenní kontroly je pak získán pouze úsek odpovídající genu UDP. Detekční limit reakce je 10% kontaminace transgenů (2,5 ng DNA transgenního organismu) ve vzorku.

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs), 10 pM primer (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer UGP-af7
- 0,5 µl primer UGP-ar8
- 0,5 µl primer GNA\_1
- 0,5 µl primer GNA\_2
- 9,5 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min. 94°C
- 30 cyklů:
  - 50 s 94°C
  - 50 s 62°C
  - 50 s 72°C
- konečná elongace 7 min. 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se separují v 1,5% agarózovém gelu v 0,5x TBE (Tris, kyselina boritá, EDTA) pufru. Jako marker molekulových vah DNA se používá 100 bp DNA ladder (výrobce NEB) a DNA fragmenty se vizualizují obarvením ethidium bromidem nebo barvivem SYBR Green a následným ozářením UV světlem. Profily se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System či jakýkoliv jiný obrazový záznam.

Chemikálie:

- PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

### qRT-PCR

Pro potřebu detekce a kvantifikace GMO, jako nástroje kontroly míry kontaminace GMO byla optimalizována metodika Real-Time PCR (PCR v reálném čase) s detekčním systémem SYBR Green I. Analýza probíhá jako dvě uniplexové PCR reakce na jednom přístroji během jednoho experimentu. Primerové páry byly navrženy pro amplifikaci úseku 140 bp transgenu pro GNA sněženky (*galantus nivalis* aglutinin) a druhý primerový pár (UGP-af7/ UGP-ar8) byl navržen jako „interní standard“ pro amplifikaci 88 bp úseku genu UDP-glucose pyrophosphorylase (Borokov et al. 1997)

Navržený metodický postup umožňuje kvantifikaci přítomného transgenu ve vzorcích. Přístroj MiniOpticon (BioRad) nabízí funkci vyhodnocení kvantifikace neznámého vzorku (qRT-PCR). Tato hrubá data však musí být dále statisticky zpracována. Během našich pokusů byly zjištěny následující limity reakce: detekční limit = 0,01% a kvantifikační limit = 0,05%. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab.2.

Tab. 2: Sekvence primerů použitých pro qRT-PCR

Primer	Sekvence
UGP-af7	5'- GGA CAT GTG AAG AGA CGG AGC – 3'
UGP-ar8	5'- CCT ACC TCT ACC CCT CCG C – 3'
GNA_1	5'- ATG GCT AAG GCA GTC TCC TC – 3'
GNA_2	5'- TCA TTA CTT TGC CGT CAC AAG – 3'

PCR reakce probíhá v objemu 20 µl, v 1x master mix DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit, 1x ROX, 0,5 µM primerů (Qiagen), a 10 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit:

- 10 µl master mix DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primeru
- 0,5 µl primeru
- 0,3 µl ROX reference dye
- 7,7 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá na Cycleru MiniOpticon (výrobce BIORAD) při následujícím teplotním profilu:

- počáteční inkubace 2 min 50°C
- počáteční denaturace 3 min 95°C
- 45 cyklů:
  - 50 s 95°C
  - 50 s 62°C
  - 50 s 72°C
- detekce melting křivky je v rozmezí 55°C – 90°C

Chemikálie:

- DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit (výrobce Finnzymes)
- ROX reference dye
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

PCR thermocykler se systémem detekce vyzařovaného signálu, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

## II.4. Metodika elektroforézy DNA

Klasickou metodou, univerzálně používanou k dělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporně nabitě elektrody směrem ke kladně nabitě. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji horizontálně uložený agarózový gel. Fragmenty o stejné velikosti-molekulové váze- postupují stejně rychle a vytvoří shluk, po obarvení pak proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se mezi báze nukleových kyselin a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, gely jsou po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě.

### *Elektroforéza v agarózovém gelu*

Příprava gelu:

1. Agaróza smícháme s vodou a pufrem v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozvaříme v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max výkon, nesmí zpěnit); agarózu musíme dokonale rozpustit, během rozváření musíme s Erlenmayerovou baňkou několikrát míchat.
2. Roztok agarózy zchladíme na cca 55°C, poté přidáme odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promícháme a nalijeme do připravené vaničky; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu naléváme opatrně a plynule, snažíme se zamezit tvorbě bublin- případně bubliny odstraníme.
3. Po nalití agarózy do vaničky umístíme hřebínek a gel se necháme 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je ponoříme do elektroforetické vany a pod hladinu pufru do jamek po hřebínku vkládáme vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky naplníme dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (cca 2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25 µl) přidáme 4 µl nanášecího pufru (LB), promícháme špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně můžeme nanést vzorky na gel a poté opatrně vložíme gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru.

Nanášecí pufr – LB (loading buffer):

- 0,25% bromfenolové modři, 40% (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpipetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (výrobce NEB) – 1 µl markeru, 10 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 23 V po dobu 30 min. a poté 90 V po dobu 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- gel fotografujeme na UV transiluminátoru pod UV světlem

Příprava gelu a pufrů:

Tab. 3: Složení 1,5% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 1,5% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. V [µl]
50	0,75	40	10	5
100	1,5	80	20	8
150	2,25	120	30	8-10
200	3	160	40	12-13

Tab. 4: Příprava pracovních roztoků TBE (Tris, kyselina boritá, EDTA) pufru.

1x pufr TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 5: Složení zásobních roztoků TBE pufru

	5x TBE
Tris (Trizma)	54
0,5 M EDTA	20 ml
kys. boritá	27,5
dH <sub>2</sub> O	voda do 1 L

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker molekulových vah
- Produkty PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba (pro rozvaření agarózy v příslušném pufru) , sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

### **Elektroforéza v SYNERGELU**

Synergel je přípravek, jehož přídavek k agaróze vytváří gel s výrazně vyšší separační možností v porovnání se standardním agarózovým gelem . Po vizualizaci separované fragmenty DNA vytváří ostřejší pruhy, dobře rozdělené. Je používán zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE (polyakrylamidový gel) se vyznačuje jednoduchostí přípravy a snadnou separací fragmentů DNA. Není toxický.

Výpočet množství Synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci Synergelu vypočítáme na základě následujícího vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

kde A je koncentrace agarózového gelu bez přídavku Synergelu, který chceme převést na Synergel/ agarózový gel

0,7 – je hodnota koncentrace základního agarózového gelu

např. v případě, kdy standardní 3% agarózový gel nahradíme gelem s přídavkem Synergelu, je složení gelu následující:

A = 3%

množství Synergelu ve směsi:  $(3 - 0,7) / 2 = 1,15\%$

1,15% Synergelu přidáme k 0,7% agarózy, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g synergelu a 1,75 g agarózy

Postup přípravy Synergel/agarózového gelu:

- Navážíme daná množství agarózy a Synergelu .
- Přidáme takové množství 100% ethanolu, aby došlo k rozmíchání (nesmí se tvořit hrudky).
- Přidáme 250 ml 0,5x TBE pufru.
- Rozvaříme v mikrovlnné troubě.
- Přidáme 5 µl roztoku ethidium bromidu.
- Důkladně promícháme.
- Nalijeme do vany / formy na gel.
- Necháme ztuhnout – cca 1–1,5 hod.

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- Synergel ( výrobce Roth)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker molekulových vah
- Produkty PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

### ***Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:***

V případě použití barviva SYBR GREEN (výhodou je nižší toxicita, lepší vizualizace DNA na gelu a nižší pozadí při vizualizaci) nepoužíváme ethidium bromid. Po ukončení PCR k reakční směsi přidáme nanášecí pufr (LB) se SYBR GREEN. Vzorky nanese na gel a spustíme elektroforézu. Po ukončení elektroforézy na UV transiluminátoru vizualizujeme DNA fragmentů/ PCR produktů. V případě dokumentace gelů pomocí kamery nebo fotoaparátu použijeme zelený filtru namísto červeného filtru, který používáme u gelů barveným ethidium bromidem !

LB se SYBR GREEN:     0,025 g Bromphenol Blue  
                              0,025 g Xylene Cyanol FF  
                              3 ml glycerol  
                              20 µl SYBR GREEN (koncentrovaný roztok, FLUKA)  
                              doplnit dH<sub>2</sub>O do 10 ml

LB rozpipetujeme do alikvot a skladojeme v temnu při teplotě -20°C, krátkodobě můžeme skladovat i při +4°C



## VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Čurn V. (2005).** Molekulární markery - protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Kubátová B., Čurn V. (2005).** Soubor metodik a laboratorních protokolů. BC ZF JU a Laboratoř molekulární biologie rostlin KB BF JU, Č. Budějovice.
- Nováková A., Čurn V. (2008).** Molecular markers in potato variety identification. Potato Research (*submitted*).
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2006).** Molecular markers as a tool for potato varieties identification. 5th Plant Genomics European Meetings, Venice, Italy, 11-14 October 2006, p. 215.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** Detection of GMO potatoes based on PCR. 6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007, p. 811.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** PCR based detection of GMO potatoes. 7th int. Symp. Recent Advances in Plant Biotechnology, Plant Biotechnology, Impact on High Quality Plant Production, Stará Lesná, June 10-16, 2007, Slovak Rep., p. 68.
- Nováková A., Šimáčková K., Kubátová B., Čurn V. (2008).** Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. Potato Res. (*submitted*).
- Sáková L., Čurn V., Sobotka R. (2000).** Comparison of different DNA isolation methods for RAPD, AFLP and PCR-RFLP analyses. Coll. Sci. Papers, Fac. Agric. České Budějovice, Ser. Crop Sci. 17, 83-91.

### III. Srovnání novosti postupů

Předkládanou „Metodiku izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.)“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není v ČR k dispozici ucelená metodika zahrnující optimalizované pracovní postupy pro izolaci DNA, analýzu molekulárních markerů, detekci a kvantifikaci GMO u brambor. Dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědecké literatuře, která se problematikou molekulárního markerování a detekce GMO pro tento účel zabývá. Komplexní vyhodnocení vhodnosti jednotlivých postupů a použitelnosti jednotlivých markerů pak dostupné není. Detekce GMO na úrovni analýzy DNA představuje ve srovnání s fenotypovou či fyziologickou detekcí GMO kvalitativně jiný přístup, který má na jedné straně obrovský potenciál využití, na straně druhé pak má i své limity. Pro nekontroverzní použití molekulárních markerů pro účely detekce a kvantifikace je naprosto nezbytné použít odpovídající postupy izolace DNA, které poskytují kvalitní DNA použitelnou pro reprodukovatelné analýzy. Rovněž v oblasti vývoje a použití jednotlivých markerů dochází k vývoji a značnému posunu a každý z markerovacích systémů má svá specifika. Reálná interpretace molekulárních dat pak vyžaduje volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Přednosti a limity jednotlivých postupů pro detekci a kvantifikaci GMO jsou předmětem předkládané metodiky.

#### IV. Popis uplatnění metodiky

Předkládaná metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.) uvádí optimalizovaný postup pro izolaci DNA a následné metody detekce/ kvantifikace GMO. Vzhledem k tomu, že metod izolace DNA je celá řada, význam této metodiky je v tom, že uvádí optimalizovanou a komplexní metodiku izolace DNA bramboru právě pro účely detekce a kvantifikace GMO. Metoda CTAB-PVP poskytuje standardní kvalitu DNA, zaručuje reprodukovatelné výsledky v případě následných analýz. Optimalizovaná metodika byla vybraná na základě rozsáhlého testování a ověřování 8 metod izolace DNA a celé škály jejich modifikací, provedených v laboratoři Biotechnologického centra JU ZF České Budějovice.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy detekce a kvantifikace GMO u brambor. Výstupem analýzy je pak spektrum markerů, které umožní zhodnocení přítomnosti/nepřítomnosti GMO ve vzorku a dále míru kontaminace vzorku, za současné kontroly správného provedení analýzy. Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a šlechtitelská, pracoviště kontrolních orgánů, která mohou s výhodou využít předností analýzy – detekce a kvantifikace GMO pomocí metod molekulární biologie. Metodika bude uplatněna prostřednictvím Ústředního bramborářského svazu, který sdružuje pěstitele a zpracovatele brambor a obchodní organizace v ČR. S Ústředním bramborářským svazem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## V. Seznam použité související literatury

- Bonfini, L., Heinze, P., Kay, S., Van den Eede, G. (2001). Review of GMO detection and quantification techniques, European Commission, Joint Research Centre, Ispra, Italy.
- Borokov, A.Y. 1997. Role of the leader intron in regulation of the expression of the potato sucrose synthase gene. *Plant Physiol.* 114 (Suppl.), 64-71.
- Ehlers, B., Strauh, E., Goltz, M., Kubsch, H., Wagner, H., Maidhof, J., Bendiek, B., Buhk, H.J. (1997). Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 4, 118-121.
- Hemmer, W. (1997). Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-Report 2/1997, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland.
- Holst-Jensen, A., Holck, A., Lillehaug, D., Løvseth, A., Berdal, K.G., Knutsen, A.K., Shahbaz, S. (2001). Development of analytical methods and detection of genetically modified maize- and soyaderived materials in selected foods on the Norwegian market in the year 2000. Joint report from the National Veterinary Institute (Veterinærinstituttet) and the Norwegian Food Control Authority (Statens næringsmiddeltilsyn, SNT).
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.H. (1997). Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 205, 442-445.
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hubner, P. (1997). Sensitive method for the detection of the genetically engineered soybean Roundup Ready. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 88, 164-175.
- Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10, 391-399.
- Meyer, R., Jaccaud, E. (1997) Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. In: Proceedings of the EURO FOOD CHEM. (IX, 8th -10th September, 1997, Interlaken, Switzerland), p. 23-28.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, Vol. 8, No. 19 4321-4326
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kubátová, B., Čurn, V. (2008). Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (*submitted*).
- Pietsche, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P., Wurz, A. (1997). Screeningverfahren zur identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensm. Rundsch.* 93, 35-38.
- Waiblinger, H.U., Pietsche, K., Brodmann, P., Wurz, A. (1997). A screening method for the identification of 'genetically modified' food of plant origin. in: Foods produced by means of genetic engineering. 2nd Status Report. Schreiber, G.A., Bögl, K.W. (eds.) Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. BgVV-Heft 1/1997, pp. 118-122.

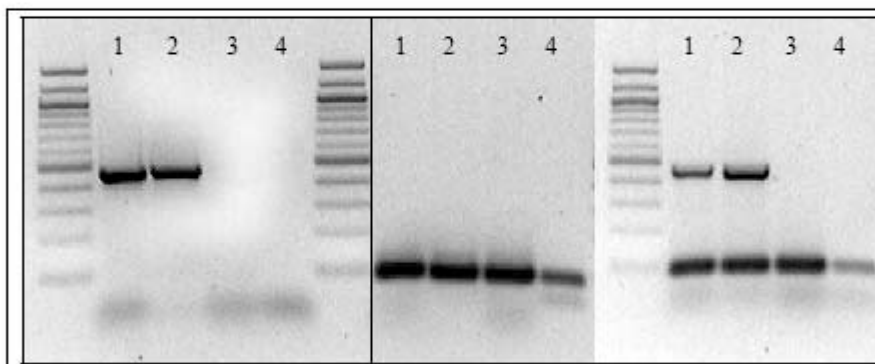
Zimmermann, A., Lüthy, J., Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soybean food samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 207, 81-90.

## VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

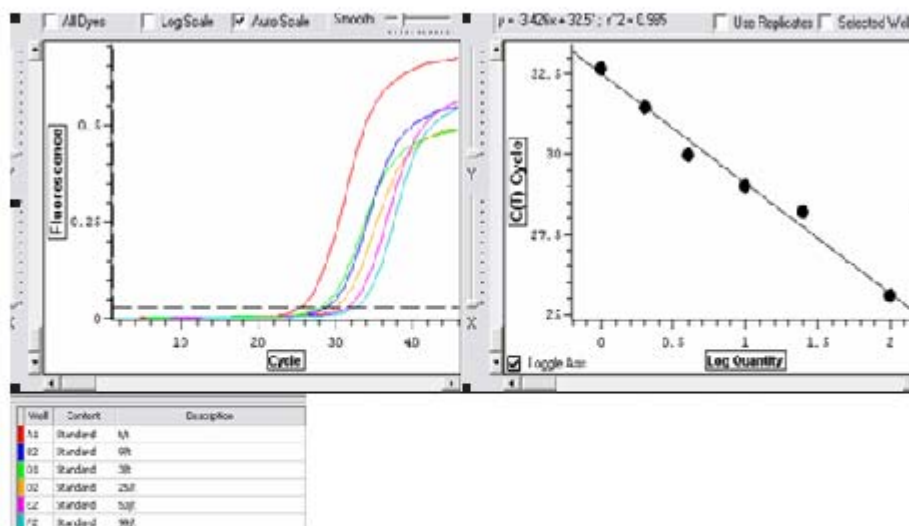
- Čurn V. (2005).** Molekulární markery - protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Kubátová B., Čurn V. (2005).** Soubor metodik a laboratorních protokolů. BC ZF JU a Laboratoř molekulární biologie rostlin KB BF JU, Č. Budějovice.
- Nováková A., Čurn V. (2008).** Molecular markers in potato variety identification. Potato Research (*submitted*).
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2006).** Molecular markers as a tool for potato varieties identification. 5th Plant Genomics European Meetings, Venice, Italy, 11-14 October 2006, p. 215.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** Detection of GMO potatoes based on PCR. 6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007, p. 811.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** PCR based detection of GMO potatoes. 7th int. Symp. Recent Advances in Plant Biotechnology, Plant Biotechnology, Impact on High Quality Plant Production, Stará Lesná, June 10-16, 2007, Slovak Rep., p. 68.
- Nováková A., Šimáčková K., Kubátová B., Čurn V. (2008).** Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. Potato Res. (*submitted*).
- Sáková L., Čurn V., Sobotka R. (2000).** Comparison of different DNA isolation methods for RAPD, AFLP and PCR-RFLP analyses. Coll. Sci. Papers, Fac. Agric. České Budějovice, Ser. Crop Sci. 17, 83-91.

## VII. Příklady výstupů detekce a kvantifikace GMO u brambor

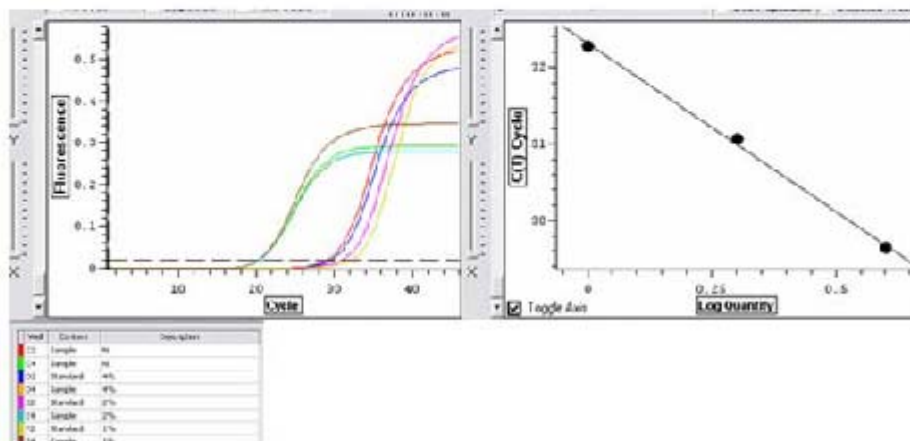
Ukázka výsledků detekce transgenu u brambor



Obr. 1: A-amplifikace lectinového genu (primery GNA), B-amplifikace bramborového genu UDP-glucose pyrophosphorylase (primery UGP), C-multiplex primerů GNA a UGP), 1A-C DNA izolovaná z transenní hlízy, 2A-C DNA izolovaná z listu transgenní rostliny, 3A-C DNA izolovaná z kontrolní hlízy, 4A-D DNA izolovaná z listu kontrolní rostliny.



Obr. 2: Standardní křivka, procento transgenů (A1) 100%, (B2) 10%, (D1) 25%, (E2) 2%, (F2) 1%.



Obr. 3: Kvantifikace neznámého vzorku, procento transgenů (D2, D4) 4%, (E2, E4) 2%, (F2, F4) 1%, (C2, C4) neznámý vzorek.

Well	Dye	Content	Description	Efficiency	Ct	%
C2	20G1	Sample	H	72.04%	29.41	5.27%

Obr. 4: Kvantifikace neznámého vzorku, vyhodnocení MiniOpticon (BIORAD)

Tab. 1: Kvantifikace neznámého vzorku, statistické vyhodnocení

sample	log	ct	%GMO
4	0,602059991	9,26	4,006851251
2	0,301029996	10,61	1,993115019
1	0	11,94	1,001738592
N		8,81	5,057006434



Název: Čurn V. a kol. (2008): Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.).

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Alena Nováková  
Ing. Kateřina Šimáčková

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne xx.xx.2008 (č.j. xxxxx/2008-xxxxx), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [VCurn@seznam.cz](mailto:VCurn@seznam.cz)

ISBN: xxx-xx-xxxx-xxx-x

## 8. THE LIST OF AUTHOR'S PUBLICATIONS

### Scientific journals with IF

Nováková A., Čurn V. Molecular markers in potato breeding and variety identification, Potato Research (submitted to edition)

### Reviewed journals

Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. Utilization of molecular markers based on microsatellites polymorphism for potato variety identification cultivated in CR, JCEA (submitted to edition)

Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses, Czech J. Genet. Plant Breed., 45, 2009 (1): 1–10

### Methodology

V. Čurn, A. Nováková, K. Šimáčková, B. Kubátová. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) / Methodology of DNA isolation and molecular markers analysis for description of genetic resources and identification of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.), ISBN: 978-80-7394-135-2.

V. Čurn, A. Nováková, K. Šimáčková. Metodika izolace DNA a detekce GMO u brambor (*Solanum tuberosum* L.) / Methodology of DNA isolation and GMOs detection in potato (*Solanum tuberosum* L.)

### Conferences

Bárta J., Kubátová B., Nováková A., Heřmanová V., Čurn V., Diviš J. (2006): Methods of potato genotypes characterization. Metody charakterizace genotypů brambor. Proc. Symp. Biotechnology 2006, 15.-16.2.2006, Scientific Pedagogical Publishing, Č. Budějovice, Czech Republic, pp. 523-525.

Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2006): Molecular markers as a tool for potato varieties identification. - 5th Plant Genomics European Meetings, Venice, Italy, 11-14 October 2006, p. 215.

- Nováková A., Čurn V., Bárta J., Heřmanová V. (2006): Využití technik SSR a ISSR pro identifikaci odrůd brambor. - Agroregion 2006, Sbor. VI. mezinár. věd. konf., České Budějovice 24.-25.8.2006, JU v Č. Budějovicích, pp. 97-102.
- Nováková A., Čurn V., Bárta J., Šimáčková K., Heřmanová V. (2006): SSR, ISSR and retrotransposon based markers and its application to potato variety identification. - EAPR-EUCARPIA The Science of Selection: Potato Breeding Methodology for the 21st Century, Carlow, Ireland, 20th-22nd November 2006, p. 47.
- Šimáčková K., Nováková A., Čurn V., Landa Z. (2006): Utilisation of molecular and morphological markers for an assessment of genotypic and phenotypic variability after targeted passaging and mutations of entomopathogenic fungi. - 10<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Praha, 24-28 June 2006, p.123.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007): Detection of GMO potatoes based on PCR.- 7th International Symposium in Series Recent Advances In Plant Biotechnology, Stará Lesná, Slovak Republic, 10-16 June 2007 (ústní prezentace).
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007): Potato variety identification by molecular markers.- 6th Plant Genomics European Meeting, Tenerife, Spain, 3-6 October 2007.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007): Detection of GMO potatoes based on PCR.- 6th Plant Genomics European Meeting, Tenerife, Spain, 3-6 October 2007.
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kukulíková, B., Bárta, J., Čurn, V. (2008): SSR and retrotransposon based markers and their application to potato varieties identification. – XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12-17,2008, p.76.
- Kukulikova, B., Curn, V., Koprna, R., Novakova, A., Simackova, K. (2008): The comparison of Polymorphism and Expression of SLG Gene in the Varieties and SI/SC Lines of Oilseed Rape. - XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12-17,2008, p.76.
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kukulíková, B., Bárta, J., Čurn, V. (2008): PCR based detection and quantification of GMO potatoes, utilization and comparison. - XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12-17,2008, p.88.
- Šimáčková, K., Čurn, V., Nováková, A., Kukulíková, B. (2008): Application of Molecular Markers for Characterization Fungal Strains and Evaluation of their Genetic Structure

and Stability. - XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12-17,2008, p.252.

Nováková, A., Šimáčková, K., Bárta, J., Čurn, V. (2008): Molecular markers and their application in potato variety identification and GMO testing. ABIC 2008, August 24-27. 2008, Cork, Irsko, p.12

Nováková, A., Šimáčková, K., Kukulíková, B., Čurn, V. (2008): Molecular markers as a tool for plant breeding and variety identification. – 18. EUCARPIA General Congress, Valencia 2008. p. 699

Nováková, A., Šimáčková, K., Čurn, V. (2009): Molecular Markers In Potato Variety Identification And Germplasm Description. PAG XVII, San Diego 2009. p.65.

### **List of grants**

**2005 – 2008** grant NAZV 1B44011 development and testing of analytical methods system for practical characterization of potato variety registered in Czech Republic

**2006 – 2007** European grant TRACENET

**2006 – 2007** grant GACR 31-H160

**2006** grant IG: Development and application of molecular markers in potato breeding

**2007** grant IG: Utilization of molecular markers based on retrotransposons for potato variety identification and breeding

**2008 -** GACR 521/08/H042

**2008** grant IG: Utilization and comparing of analyses based on PCR for GMO detection and quantification in potato

## 9. SUMMARY IN CZECH

V předkládané disertační práci se zabývám možností využití molekulárních markerů pro charakterizaci bramboru. Studované metodické postupy jsem včetně izolace DNA optimalizovala pro použití v konkrétních podmínkách.

V první fázi jsem se zaměřila na ověření, v literaturou doporučených, molekulárních respektive DNA markerů (RAPD, SSR, AFLP) a metodických postupů s ohledem na jejich užití pro identifikaci odrůd brambor. Problematika RAPD markerů byla na pracovišti Biotechnologického centra řešena ještě před mým nástupem na doktorské studium, na tehdejší výsledky jsem tedy navázala a tuto metodu jsem shledala nevhodnou pro řešení daného úkolu. Metoda SSR markerů se jevila jako nejvhodnější z prověřovaných markerovacích systémů, jak z hlediska poskytovaného polymorfismu, tak pro svou nižší materiální a časovou náročnost ve srovnání s AFLP markery, jejichž aplikace bude na pracovišti řešena v nejbližší době. Analýza SSR markerů byla tedy použita, jak pro pilotní studii, tak i pro následný screening souboru 164 dostupných odrůd brambor registrovaných v České Republice. Výsledek tohoto screeningu je dostupný v internetové databázi <http://www.katalogbrambor.cz>.

Dále jsem se zamýšlela nad použitím jiných DNA markerovacích systémů vhodných pro řešenou problematiku. Postupně jsem zařadila do studie ještě analýzu mikrosatelitů ISSR, která se podle literaturou uváděných výsledků jevila jako vhodná. ISSR analýza sice poskytovala vyšší počet amplifikovaných pruhů, ale při opakovaných analýzách jsem zjistila jak variabilitu uvnitř odrůd tak i nestabilitu tohoto markerovacího systému v závislosti na stáří a původu DNA. Další oblastí zájmu se poté stala analýza transponibilních elementů respektive retrotransponů a to především analýza IRAP. Tato metodika se jeví jako vhodná i s ohledem na vyšší požadovanou kvalitu DNA a obtížnější reprodukovatelnost v závislosti na velkém počtu amplifikovaných pruhů, jež však na druhou stranu zajistí možnost přesné identifikace jednotlivých odrůd brambor i v tak velkém souboru genotypů. Analýza IRAP markerů byla tedy použita jak pro pilotní studii, tak i pro následný screening souboru 164 dostupných odrůd brambor registrovaných v České Republice. Výsledky tohoto screeningu budou dostupné v internetové databázi na <http://www.katalogbrambor.cz>.

Dalším úkolem, který jsem se rozhodla řešit, byla problematika testování GMO u brambor. Podle znalostí získaných z dostupné literatury jsem zvolila metodu multiplex PCR, respektive duplex PCR, pro detekci GMO u brambor. Pro následnou kvantifikaci GMO u brambor jsem zvolila metodu Real-Time PCR. Obě testované metody jsou vhodné

pro řešení dané problematiky a poskytují dostatečné detekční a kvantifikační limity s ohledem na použití.