



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

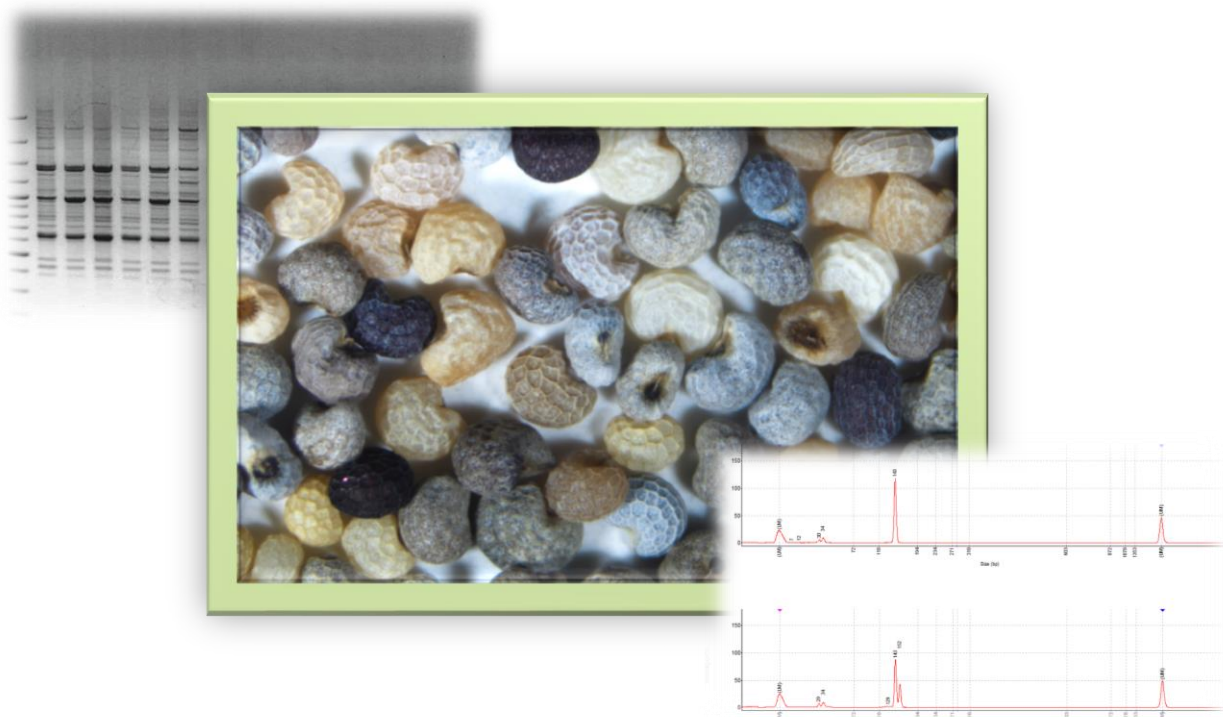


---

# Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů

---

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 - Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi



Autoři: Ing. Eva Jozová, Ph.D., Ing. Martina Stará, Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.,  
Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2020



**Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého  
(*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 - Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi

Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Ing. Martina Stará

Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D

České Budějovice, 2020

Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého  
(*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů

Eva Jozová a kol., 2020

vondre01@zf.jcu.cz

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné, Biotechnologické centrum ZF JU  
v Českých Budějovicích, České Budějovice 2020

[www.zf.jcu.cz](http://www.zf.jcu.cz), <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Agritec, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.

<http://www.agritec.cz/cs>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1810391 - Využití technik genomiky  
a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se  
specifickými vlastnostmi.

Recenzenty metodiky byli:

oponent 1 Ing. Petr Zehnálek, ÚKZÚZ

oponent 2 prof. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani, ČZU Praha

*Text: ©2020 Jozová E., Stará M., Horáček J., Ludvíková M., Čurn V.*

*Foto: ©2020 Jozová E., Stará M., Horáček J., Ludvíková M.*

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-826-9

## Obsah

Cíl metodiky.....	5
Vlastní popis metodiky.....	7
Úvod.....	7
Metodika analýzy mikrosatelitů (SSR).....	9
Příprava rostlinného materiálu pro izolaci.....	9
Izolace DNA pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle, 1991).....	10
Měření koncentrace templátové DNA.....	11
Přečištění DNA pomocí octanu sodného.....	12
Analýza mikrosatelitů.....	13
Gelová elektroforéza.....	14
Čipová elektroforéza.....	15
Vyhodnocení analýzy.....	16
Fragmentační analýza.....	16
Porovnání zobrazovacích metod.....	17
Metodika analýzy IRAP markerů.....	19
Příprava rostlinného materiálu pro izolaci.....	19
Izolace DNA pomocí ISOLATE II Plant DNA Kit (Bioline).....	19
Analýza DNA markerů metodou IRAP.....	20
Příprava 1,5% agarózového gelu.....	22
Vyhodnocení získaných elektroforeogramů.....	23
Statistické zpracování dat.....	23
Porovnání metod.....	24
Srovnání novosti postupů.....	25
Popis uplatnění metodiky.....	25
Ekonomické aspekty.....	26
Seznam publikací předcházející metodice.....	28
Seznam použité literatury.....	28
Přílohy.....	30
Obrazová příloha SSR.....	30
Obrazová příloha - IRAP.....	35
Použité roztoky.....	40



## Cíl metodiky

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je stará kulturní plodina s dlouholetou tradicí pěstování v našich zemích. Mák je třetí nejpěstovanější olejní plodina pěstovaná u nás na ploše přesahující 30 tisíc hektarů a tato plodina poskytuje všestranné využití. Česká republika je tak nejvýznamnějším světovým legálním pěstitelem máku. V České republice je zaměřeno pěstování na odrůdy máku s nízkým obsahem alkaloidů morfinového nebo papaverinového typu. Tyto odrůdy poskytují olejnatá semena s dobrými dietetickými vlastnostmi využívanými v potravinářství. Naopak ve světě se pěstují odrůdy s vysokým obsahem alkaloidů v makovině využitelnými mimo jiné ve farmaceutickém průmyslu.

V důsledku intenzivního šlechtění, kdy se šlechtitelé zaměřují pouze na některé vlastnosti, dochází k zužování genetické variability u zemědělských plodin. Dříve používané morfologické znaky, které byly jediným nástrojem pro hodnocení odrůdové pravosti, již nejsou dostačující pro určení genetické variability. Jako vhodný nástroj k upřesnění genetické variability pak mohou být molekulární markery, které jsou schopné detekovat DNA polymorfismus mezi jednotlivými odrůdami a pomoci lépe porozumět genetické struktuře rodičovských komponent. Spojení morfologických charakteristik a molekulárních markerů se tak stává účinným nástrojem pro výběr vhodných genotypů, selekci žádaných rostlin a udržení dostatečné genetické rozmanitosti.

Cílem předložené metodiky je popis genetické diverzity genetických zdrojů máku pomocí analýzy mikrosatelitů a metody IRAP. Tyto metody nejenže umožňují popis a charakterizaci genetických zdrojů, ale také najdou své uplatnění ve šlechtění rostlin, semenářství (hodnocení čistoty a pravosti osiva) a potravinářství (ověření pravosti „českého máku“, tak aby nemohl být zaměňován s genotypy, které neodpovídají této charakteristice). Nespornou výhodou analýz je možnost identifikace genotypu ve vzorku semen, rostlin, potravinářských surovin i hotových výrobků.





## Vlastní popis metodiky

### Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je stará kulturní plodina, jejíž původ není zcela znám (Novák, 1992) a patří do čeledi makovitých, která zahrnuje přibližně 120 druhů. Kromě máku setého se lze v Čechách setkat i s výskytem dalších druhů máku, jako je např. mák pochybný (*Papaver dubium*), mák Lecoqův (*Papaver lecoqui*), mák časný (*Papaver cosine*), mák bělokvětý (*Papaver maculosum*), mák polní (*Papaver argemone*) a vzácně mák zvrhlý (*Papaver hybridum*) a zejména nejznámější druh mák vlčí (*Papaver rhoeas*) (Baranyk a kol., 2010).

Pro své všestranné využití především v potravinářském a farmaceutickém průmyslu je mák pěstován v mnoha zemích světa. Česká republika je celosvětově považována za nejvýznamnějšího a největšího legálního producenta máku setého pro potravinářské účely. Potravinářský mák se zásadně liší od „opiových“ máků tím, že jeho mléčnice téměř neprodukuje latex a obsah alkaloidů je (velmi) nízký. Semena potravinářského máku mají výborné dietetické vlastnosti a jsou často používána pro přípravu makového pečiva. V České republice se pěstuje převážně mák s moudrou barvou semen, avšak v posledních letech dochází ke zvýšení osevních ploch máku s bílou barvou semen. Předpokládá se, že tato tendence bude do budoucna pokračovat (Liška, 2019; Vašák, 2010). V roce 2019 byla osevní plocha máku 36 tis. ha, tedy nejvyšší za posledních 10 let, s hektarovým výnosem 0,71 t/ha ([www.czso.cz](http://www.czso.cz)).

Obdobně jako u dalších plodin i u máku probíhá intenzivní šlechtění. Hlavními šlechtitelskými cíli jsou výnosová stabilita, snížení obsahu alkaloidů, kvalitativní parametry semene a tolerance k suchu. Klíčovým předpokladem pro vyšlechtění nových odrůd je dostatečný rozsah genetické variability šlechtitelské populace a dostupná rozsáhlá genetická rozmanitost vyskytující se v souborech genetických zdrojů (FAO 2018). Genetická diverzita je důležitým faktorem pro reprodukční vitalitu druhu, jeho odolnost vůči stresu a schopnost adaptace na různé podmínky prostředí. Obecně se jedná o genetickou variabilitu v rámci druhu, a to mezi geograficky oddělenými populacemi, tak i mezi jedinci jedné populace (Calişkan, 2012). Poznání genetické variability – rozsahu genetické diverzity ve šlechtitelských populacích či v kolekcích genetických zdrojů rostlin je potřebné nejen z pohledu novošlechtění a získávání nových odrůd, ale i z pohledu ochrany genetické diverzity a cenných „core“ kolekcí genetických zdrojů rostlin. Metody molekulární biologie poskytují kvalitativně novou úroveň pro charakterizaci genetické diverzity kolekcí genetických zdrojů rostlin. Zároveň je též možné hodnotit míru genetické podobnosti či odlišnosti populací genetických zdrojů rostlin. Tyto metody umožňují i jednoznačnou identifikaci genetických zdrojů a umožňují hodnotit duplikace v kolekcích genetických zdrojů (Lahiry et. al., 2018).

Význam molekulárních metod identifikace genetických zdrojů či odrůd rostlin roste s intenzitou šlechtění a zvyšujícím se počtem registrovaných odrůd, které jsou morfologicky podobné (obdobný selekční tlak) a obtížně odlišitelné (nedostatečný počet morfologických znaků, poměrně malá variabilita v morfologických znacích,

zúžená genetická variabilita). Navíc morfologické znaky jsou ovlivňovány environmentálními a klimatickými podmínkami, což snižuje jejich vypovídací hodnotu. Aby mohly být tyto vlivy eliminovány, jsou morfologické znaky stále častěji doplňovány moderními molekulárními technikami (Korir, 2012). Tato problematika je ale častější v případě šlechtění odrůd pro farmaceutické využití a šlechtění na množství a obsah různých druhů alkaloidů. Znalost genetické rozmanitosti a dostupnost těchto genetických zdrojů je potřebná právě pro navržení efektivního plánu šlechtění, který vede k dosažení šlechtitelských cílů a vyšlechtění odrůd přizpůsobených k různým agro-klimatickým podmínkám (Lahiri et. al., 2018). Díky znalosti genetické diverzity můžeme i předcházet zužování genetické základny máku setého.

## Metodika analýzy mikrosatelitů (SSR)

Mikrosatelity jsou krátké tandemové motivy, obsahující 1-6 párů bází. Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50-ti kopiích (Ashkenazi et al., 2001). Mikrosatelity mohou být nalezeny jak v kódujících, tak i nekódujících úsecích genomu (Varshney et al., 2005). Mikrosatelity se řídí jednoduchou mendelistickou dědičností, proto mohou být při použití pro velmi příbuzné druhy konzervativní, ovšem pro odlišení odrůd se ukázaly jako vhodný nástroj (Pilinsky et al., 2011). Počet opakování jednotky v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu. Délku alely lze zjistit po elektroforetické/fragmentační analýze PCR produktů daného lokusu díky použití primerů specifických pro příslušný lokus (Čurn et al., 2012).

## Příprava rostlinného materiálu pro izolaci

Pro obě molekulární metody byly použity materiály poskytnuté Ing. Andreou Rychlou ze společnosti OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. Tento materiál zahrnuje staré krajové odrůdy, šlechtitelský materiál a nové moderní odrůdy.

Pro každou odrůdu či šlechtitelský materiál bylo vyseto do substrátu minimálně 36 semen. Rostliny se nechaly dorůst do fáze děložních listů. Po jednom až dvou týdnech se rostliny odebraly do papírových sáčků po jednotlivých odrůdách a nechaly se vysušit jeden týden v silica gelu. Při odběru materiálu je důležité zabránit kontaminaci mezi jednotlivými odrůdami sterilizací nástrojů. Po důkladném vysušení byl materiál převeden do 2 ml sterilních mikrocentrifugačních zkumavek. Přidaly se 2 skleněné kuličky a materiál se zhomogenizoval pomocí homogenizátoru (Beat Ruptor 96) po dobu 30 sec a při maximální frekvenci. Takto zhomogenizovaný materiál byl ihned izolován nebo uskladněn při -20°C až do doby samotné izolace.

Pokud není k dispozici robotický homogenizátor, je možná ruční homogenizace.

*Obrázek 1 Ukázka rostlinného materiálu ve fázi před odběrem vzorků*



## **Izolace DNA pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle, 1991)**

Tato metoda je vhodná pro izolaci DNA z většího množství rostlinného materiálu. Získaná DNA je velmi kvalitní a čistá, při dlouhodobém skladování nedegraduje. Ověřená doba použití DNA pro analýzy je až 4 roky, pokud je uchována při -20 °C. Takto čistá DNA je velmi vhodná při využití metod AFLP, SSR a ISSR.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45M 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 jej lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

### **Použité přístroje**

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák digestoř

### **Chemikálie**

- ethanol (96%, 70%)
- 2x CTAB-PVP extrakční pufr (2% CTAB, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1,4M NaCl, 1% PVP-40000)
- 2-merkapt ethanol
- 5% CTAB
- chloroform:IAA (24:1)
- 1x TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA)
- isopropanol

### **Pracovní postup**

- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 1000 µl extrakčního pufru (2x CTAB-PVP + 1 % β-merkapt ethanolu), materiál promíchat s pufrem
- nechat 45-60 min inkubovat při 65 °C ve vodní lázni, promíchat každých 15 minut
- centrifugovat na 14 000 rpm (maximum) 10 minut
- převést supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 750 µl chloroformu:IAA (24:1) a 10 min nechat protřepávat
- centrifugovat 5 min při maximálních otáčkách
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 1/5 (cca 200 µl) 5% CTAB a promíchat
- přidat 750 µl chloroformu:IAA (24:1) a 10 minut protřepávat
- centrifugovat 5 min při maximálních otáčkách
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 2/3 izopropanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20 °C přes noc

- centrifugovat 5 minut při 4 °C na maximální otáčky
- odstranit supernatant
- přidat 300 µl TE a nechat 30-60 minut rozpouštět na třepačce při 37 °C
- přidat 2 objemy (600 µl) 96% studeného ethanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20 °C 12 hod
- centrifugovat 10 minut při 4 °C na maximální otáčky
- odstranit supernatant
- přidat 1000 µl 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min při maximálních otáčkách
- odstranit supernatant
- přidat 1000 µl 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min při maximálních otáčkách
- přebytečnou tekutinu odpipetovat a nechat sušit při 37 °C po dobu 15 - 20 minut (nenechat pelet přeschnout, špatně se rozpouští)
- přidat 200 µl TE pufru a cca 40 minut nechat rozpouštět při 37 °C
- skladovat v -20 °C

## Měření koncentrace templátové DNA

Analýza mikrosatelitů je velmi citlivá na čistou DNA se stejnou koncentrací u všech používaných vzorků. Proto je třeba určit koncentraci DNA vhodnou metodou. Roztok nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleových kyselin, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů.

Pro potřeby měření koncentrace byl použit spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu). Sledovány byly zejména parametry: koncentrace DNA vyjádřená v ng/µl, poměr 260/280, který by měl být v ideálním případě v rozmezí 1,8-2,0 a poměr 260/230, který by měl mít hodnoty od 2,0 do 2,2.

### Postup

- napipetovat 1,5 µl slepého vzorku dle pufru, ve kterém je DNA rozpuštěna (1x TE pufr, milliQ voda nebo chelex)
- postupně nanášet 1,5 µl každého vyizolovaného vzorku (před nanášením je potřeba lehce promíchat, před samotným měřením v programu vzorek popsat)
- výstupem je tabulka dat (koncentrací DNA a parametrů čistoty) ve formátu pdf. nebo xls.

Pokud DNA vzorku nedosahuje potřebných hodnot, je třeba vzorky přechistit, např. pomocí octanu sodného.

## **Přečištění DNA pomocí octanu sodného**

### **Použité přístroje**

- centrifuga, vortex, sada automatických pipet, termoblok

### **Chemikálie**

- octan sodný - 3M NaAc
- 96% a 70% ethanol
- 1x TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA)

### **Pracovní postup**

- do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky napipetovat 20  $\mu$ l vyizolované DNA, 2  $\mu$ l NaAc a 50  $\mu$ l EtOH 96%
- lehce zvortexovat a nechat stát 15 min při laboratorní teplotě
- centrifugovat 30 min při 13 000 rpm
- opatrně odstranit supernatant
- přidat 250  $\mu$ l EtOH 70%, promíchat a centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 15 min
- dokonale odstranit všechny EtOH nejlépe odpipetováním a nechat zcela vysušit
- přidat 20  $\mu$ l TE pufru a nechat rozpustit při 37 °C
- pokud nebudeme ihned použít, uskladnit při -20 °C

## Analýza mikrosatelitů

Analýza mikrosatelitů je často využívanou metodou pro identifikaci odrůd. Výhodou této analýzy je poměrně velké množství známých mikrosatelitních lokusů a jejich výskyt v genomu, kodominantní dědičnost, dostupné techniky analýzy mikrosatelitních (SSR) markerů a jejich opakovatelnost (Seyfert et. al., 2008).

*Tabulka 1 Sekvence specifických primerů použitých pro SSR analýzu*

<b>Primer</b>	<b>Sekvence primeru ´5-3´</b>	<b>Velikost fragmentů</b>	<b>Autor</b>
<b>psom4</b>	GCAGAAGATGAAAAGTTAAA TCTCTTATTGCTGTTTCAGTT	155-167	Ondreičková (2017)
<b>psom 17</b>	AAACAATCACTGACTACTCG GTAGTGGGTTTTAGGAGTTT	101-122	Ondreičková (2017)
<b>OPEST026</b>	GTGAGGAGGACGAGCTTTTG gtttcttCCGTTGTAAATACCGACTGC	120-154	Vašek (2019)
<b>OPEST081c</b>	AGTAAAACGATCCGTACCTACCTGA CGTTTTTCTACAGGGTTGATTTCTGA	166-172	Vašek (2019)
<b>OPEST053</b>	TCAATACCCACAAAAGGAGGA gtttcttTCAAGACAAAGAAACCAAGCCA	193-209	Vašek (2019)
<b>OPEST106</b>	CACCAAATCTCATTGCCTGA CCCTAATCGGATGGATCAAA	184-193	Vašek (2019)
<b>OPGSSR001</b>	TGCGGCTTCTAATCATCCTT CCATCAACTTCGCACAGCTA	216-241	Vašek (2019)
<b>OPEST061</b>	GGCTGCTGCTTCTTTTCATC ATAGGGCAAACCTGCCTGCTA	225-237	Vašek (2019)
<b>psSSR57</b>	GGCATAGAGGCTTCATCTACT GAAGGGGTGTTGTATGTGTAG	202-229	Ondreičková (2017)
<b>psSSR69</b>	ATAGATTTATTTGGCCACCT CACCTATTGATTGAGGATGAA	155-166	Ondreičková (2017)

### Složení PCR reakce

- 2x PPP Master Mix (150mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25 °C), 40mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween, 20,5mM MgCl<sub>2</sub>, 400μM dATP, 400μM dCTP, 400μM dGTP, 400μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva) **nebo** 2xGoTaq® G2 Green Master Mix (GoTaq® G2 DNA Polymerase je dodána v 2X Green GoTaq® G2 Reaction Buffer (pH 8.5), 400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP a 3mM MgCl<sub>2</sub>)
- 2x BSA (NEB)
- 10 pmol primeru forward a reverse
- 100 ng templátové DNA

### Schéma pipetování

- 12,5 μl Master Mix
- 10,3 μl PCR vody
- 0,5 μl každého primeru
- 0,2 μl BSA
- 1 μl DNA (100 ng/μl)

### Teplotní profil

- |                        |        |        |
|------------------------|--------|--------|
| • počáteční denaturace | 5 min  | 94 °C  |
| • 35 cyklů:            | 45 sec | 94 °C  |
|                        | 1 min  | 55 °C  |
|                        | 1 min  | 72 °C* |
| • konečná elongace     | 5 min  | 72 °C* |
| • stop                 | ∞      | 4 °C   |

\* pokud je použit master mix 2xGoTaq®, pak je teplota elongace 68 °C

### Gelová elektroforéza

PCR produkty se pro kontrolu úspěšné amplifikace rozdělují na 3% agarozovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB). DNA se vizualizuje barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem a spektrum fragmentů se zaznamená pomocí software InGenius 3 (Syngene).

### Použité přístroje

- elektroforéza, laboratorní váhy, zdroj elektrického napětí, pipeta, mikrovlnná trouba, dokumentační systém

### Chemikálie

- agarózové tablety (Serva), 1x TBE, ethidium bromid

### Pracovní postup

- do 500ml Erlenmeyerovy baňky vložit 6 tabletek agarózy
- přidat 100 ml 1x TBE a nechat zcela rozpustit



- rozvařit roztok agarózy a TBE v mikrovlnné troubě tak, aby nebyla zřetelná žádná vlákna, přidat 6  $\mu$ l ethidium bromidu
- rozvařit při nejnižším výkonu mikrovlnné trouby a velice často promíchávat, gel má tendenci velice rychle vypěnit a vytéct
- zchladit a nalít rozvařenou agarózu do připravené vany s „hřebínkem“, který vytvoří oddělené jamky, nalitá agaróza nesmí obsahovat žádné vzduchové bubliny
- nechat agarózu úplně zatuhnout a vyjmout hřebínek
- vložit agarózový gel do elektroforetické vany, ve které je roztok 1x TBE
- napipetovat do jednotlivých jamek vzorky – do první a poslední jamky hned za vzorky napipetovat Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB)
- připojit k napájecímu zařízení a napětí nastavit na 40 V, cca po 5-ti minutách (po „vyjetí“ vzorků ze slotů), zvýšit napětí na 90 V
- doba průběhu elektroforézy trvá cca 1,5-2 hodiny
- po uplynutí této doby vyjmout gel z pufru a vyfotografovat pod UV světlem v dokumentačním zařízení
- vyhodnotit záznam gelu speciálním softwarem

## Čipová elektroforéza

Jednou ze separačních metod, kterou lze použít pro analýzu SSR markerů je čipová elektroforéza. Tato metoda nahrazuje klasickou elektroforézu a její výhodou je eliminace práce s ethidium bromidem a dále analýza až 96 vzorků najednou.

Čipová elektroforéza je založena na principu automatického nanášení vzorků pomocí mechanického ramene na skleněný čip. Při elektroforéze na čipu je možné dosáhnout vysoké účinnosti při aplikaci vysokého napětí, přestože separační kanál je krátký (Wu et al., 2008). Čipová elektroforéza získala na popularitě díky svému všestrannému využití např. při monitoringu životního prostředí, v biomedicínských a farmaceutických analýzách, klinické diagnostice či forenzním šetření. Tímto způsobem lze separovat proteiny, DNA i RNA (Chang et al., 2010).

Výstupem čipové elektroforézy je buď zymogram vhodný pro odečítání amplifikovaných fragmentů a nebo elektroforeogram, který zaznamená přesnou velikost fragmentu.

### Použité přístroje

- čipová elektroforéza MultiNA (Shimadzu), sada automatických pipet, PC pro zobrazení

### Chemikálie

- PCR produkty (min. 6  $\mu$ l), kit pro čipovou elektroforézu DNA-1000 (separační pufr, Marker solution), millig H<sub>2</sub>O, 25 bp DNA ladder (Low Molecular Weight DNA Ladder - NEB), barva - SYBR® Gold

## **Příprava chemikálií**

*barva:*

- 99 µl TE pufru + 1 µl barvy SYBR® Gold
  - barvu je třeba udržovat stále v temnu
  - používají se černé mikrozkušavky eppendorf

*ladder:*

- 49 µl TE pufru + 1 µl Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB)
  - napipetovat do 0,2ml mikrozkušavky bez víčka (ustřižený strip)

## **Pracovní postup**

- separační pufr s naředěnou barvičkou se míchá do vialky, která je součástí kitu dle počtu analyzovaných vzorků (viz. tabulka 2)
- Marker solution se přepipetuje do dodané vialky
- vložit napipetované vzorky nejlépe v PCR destičce do určené pozice
- vložit všechny připravené chemikálie do barevně označených otvorů podle použitého kitu
- zajistit krytem
- nastavit data do programu MultiNA control (Shimadzu)
- spustit analýzu

*Tabulka 2 Ředění separačního pufru s barvou dle počtu analyzovaných vzorků*

<b>počet vzorků</b>	<b>8 a méně</b>	<b>9 - 29</b>	<b>30 - 79</b>	<b>80 - 120</b>
<b>objem separačního pufru</b>	495 µl	990 µl	1980 µl	2970 µl
<b>objem naředěné barvy</b>	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl
<b>celkový objem</b>	500 µl	1000 µl	2000 µl	3000 µl

## **Vyhodnocení analýzy**

Výstupem čipové elektroforézy je buď zymogram vhodný pro odečítání amplifikovaných fragmentů a nebo elektroforeogram, který zaznamená přesnou velikost fragmentu. Výsledky jsou zaznamenány ve formě binární matice podle přítomnosti či nepřítomnosti fragmentů.

## **Fragmentační analýza**

Fragmentační analýza probíhá v genetickém analyzátoru a principiálně se jedná o kapilární elektroforézu DNA fragmentů značených tzv. fluofory., které při průchodu kapilárou a po ozáření laserem emitují světlo různé barvy (Schuelke, 2000; Blacket et al., 2012). Výstupem je chromatogram s „píky“ jejichž poloha je porovnána se známým standardem, což je soubor fragmentů známé délky značený

odlišnou fluorescenční značkou analyzovaný společně se vzorkem. Tímto způsobem můžeme určit velikost ampliconu a typ alely specifické pro testovaný chromozom. Pokud je používáno více značených primerů (standardně 6-FAM, VIC, NED, PET), je možné dosáhnout výrazného snížení nákladů pro analýzu, protože lze využít takzvaného multiplexu, tedy analýzy několika (až 4) PCR produktů v jednom kroku (Butler 2005; Jozová et al., 2014).

### **Příprava vzorků pro FA**

#### *Složení PCR reakce pro FA*

- 5 µl Master Mix
- 3,75 µl PCR vody
- 0,1 µl každého primeru (10 pmol)
- 0,05 µl BSA
- 1 µl DNA (5-10 ng/µl)

#### *Složení 1 vzorku pro FA:*

- 10 µl Hi-Di Formamide
  - 0,5 µl Size Standard GeneScan 500 LIZ
  - 1 µl PCR reakce
- takto připravený vzorek inkubovat při 94 °C po dobu 5 minut  
- zchladit po dobu minimálně 2 minut

### **Porovnání zobrazovacích metod**

Všechny tři zobrazovací metody jsou vhodné pro vyhodnocení SSR markerů. Výsledky jsou zaznamenány ve formě binární matice podle přítomnosti či nepřítomnosti fragmentů. Výhody a nevýhody jednotlivých zobrazovacích metod jsou uvedeny v tabulce 2.

Binární matice je následně importována do programu např. MVSP a následně vyhodnocena pomocí PCO analýzy či použita pro výpočet matice podobnosti.

*Tabulka 3 Porovnání zobrazovacích metod pro marker SSR*

	<b>agar. gel</b>	<b>čipová Elfo</b>	<b>FA</b>
<b>finanční náročnost</b>	nízká	střední	vysoká
<b>detekce od (počet bází)</b>	10 bp	3bp	1bp
<b>opakovatelnost</b>	střední	střední	vysoká
<b>množství produktu (µl)</b>	15	6	1
<b>požadavek na kvalitu DNA</b>	střední	střední	vysoký
<b>citlivost na koncentraci DNA</b>	ne	ano	ano
<b>pracnost</b>	nízká	střední	střední
<b>použití nebezpečných chemikálií</b>	ano	ne	ano

Vyhodnocovací metoda se odvíjí od polymorfismu jednotlivých primerů a velikostních rozdílů mezi alelami. Pokud je rozdíl větší jak 10 bází, pak je zobrazení na elektroforetickém gelu dostačující. V případě jednotek bází je třeba využít fragmentační analýzu, která poskytuje i přesné velikosti jednotlivých alel.

## **Metodika analýzy IRAP markerů**

Molekulární metoda IRAP využívá repetitivních sekvencí. Tento marker je založen na amplifikaci úseků DNA mezi retrotranspozony, které jsou ohraničeny dlouhými terminálními repeticemi (LTR) (Kalendar et al., 2000). Díky vlastnostem jako jsou vysoké zastoupení vysoce homologních sekvencí a stabilita inzerce jsou retrotranspozony vhodným fylogenetickým markerem až do úrovně druhů, odrůd či jedinců (Feschotte et al., 2002). Velkou výhodou této analýzy je jejich univerzálnost. Oproti ostatním markerům jsou retrotranspozony schopny poskytnout informace o vývojové linii či fylogenezi (Kalendar et al., 2010).

## **Příprava rostlinného materiálu pro izolaci**

Pro izolaci rostlinného materiálu byly odebrány zdravé listy mladých rostlin přímo z rostlin pěstovaných na poli. Z důvodu vnitrodruhové variability byl u každé odrůdy proveden odběr deseti listů a byl vytvořen směsný vzorek. Vzorky byly uloženy do chladicího boxu a po převozu do laboratoře byly zamrazeny při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **Izolace DNA pomocí ISOLATE II Plant DNA Kit (Bioline)**

Izolace DNA pomocí kolonkových kitů jsou rychlou alternativou jak získat čistou DNA dostačující kvality. Jejich výhodou je rychlost a pufry, které jsou součástí kitu. Nevýhodou u nich může být rychlá degradace DNA a nižší výtěžnost. Pokud je DNA potřeba jen pro jednu analýzu, je tato metoda naprosto dostačující.

Metoda je založena na navázání DNA na matrix umístěné v kolonce a jejím následném promývání. Po promytí je DNA vytěsněná z matrix pomocí PCR vody nebo elučním pufrem, který bývá z pravidla součástí kitu do čisté mikroskopické zkumavky.

### **Použité přístroje**

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, ruční homogenizátory, vortex, třepací termoblok, termostat, analytické váhy

### **Chemikálie**

- součástí kitu

### **Pracovní postup**

- do jedné mikroskopické zkumavky odvážit 10mg každého listu dané odrůdy. Celkem tedy 100 mg čerstvého materiálu na jednu odrůdu
- ke zhomogenizovanému materiálu se přidá 400  $\mu\text{l}$  Lysis Buffer PA1 a lehce zvortexovat
- přidat 10  $\mu\text{l}$  RNasy A a lehce promíchat
- vzorky inkubovat při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 min
- umístit ISOLATE II Filter (fialový) do nové 2 ml Collection Tube a napipetovat lyzát na kolonku
- přidat 450  $\mu\text{l}$  Binding Buffer PB a pipetováním asi 5x promíchat, nebo lehce zvortexovat

- umístit ISOLATE II Plant DNA spin Column (zelená) do nové 2ml Collection Tube a do kolonky napipetovat vzorek (max. 700 µl).
- Centrifugovat 1 min při 11000 g, vylít do, co proteče
- přidat 400 µl Wash Buffer PAW1. Centrifugovat 1 min při 11000 g. Co proteče vylít.
- přidat 700 µl Wash Buffer PAW2. Centrifugovat 1 min při 11000 g. Co proteče vylít.
- přidat dalších 200 µl Wash Buffer PAW2. Centrifugovat 2 min při 11000 g
- umístit ISOLATE II Plant DNA Spin Column do nové 1,5ml mikroskopavky (není součástí kitu)
- přidat přesně do středu membrány 50 µl Elution Buffer PG předeřátého na 65 °C
- nechat inkubovat 5 min při 65 °C
- centrifugovat 1 min při 11000 g
- Pokud chceme i druhý eluát, vložíme filtr do nové 1,5ml mikroskopavky a přidáme na membránu ještě 50 µl Elution Buffer PG

## **Analýza DNA markerů metodou IRAP**

Pro genotypizaci bylo po předchozím skrínungu vybráno celkem 10 kombinací primerů, které mají vysoký stupeň polymorfismu a jsou tedy vhodné pro detekci rozdílů na vnitrodruhové úrovni. Na základě výsledků z PCR analýzy byla provedena binarizace dat (odečítáním přítomnosti a nepřítomnosti fragmentů).

### **Použité primery**

*Tabulka 4 Seznam sekvencí použitých primerů*

<b>Primer</b>	<b>Sekvence (3' - 5')</b>
IRAP 3	CCG TCA AAA TCC GAG TTT GTA CG
IRAP 5	GAT TCA GCG TCG TAG ACG CAC C
IRAP 9	ATA GAA GCC AGG TCA ACC CGC AC
IRAP 16	GTA GCC ACC GTC GGC CAA CTT CC
IRAP 18 21	GGA TGC ATT TTG GGG AAA GCT A
IRAP 19	AGC TGA AAG TCC TGA TTT CCC CT
IRAP 21	CCT GTA AAG AGC ACA AAG ACG T
IRAP a5-2	CCA ACC ACT GCC GAA TAT CG
IRAP a5-5	CGC AGT GGC TAA GTG GGG AC
IRAP a14-4	ATG AGT GGA GCG ACC CTT CCA
IRAP d10-2	TGG TTT GTG ATA CAG ACT CAC CT

*Tabulka 5 Použité kombinace primerů IRAP*

Číslo	Primer 1	Primer 2
1	IRAP 3	-
2	IRAP a5-2	-
3	IRAP a5-5	-
4	IRAP a14-4	-
5	IRAP d10-2	-
6	IRAP 18	-
7	IRAP 3	IRAP 9
8	IRAP 5	IRAP 9
9	IRAP 16	IRAP 21
10	IRAP 19	IRAP 21

### **Použité chemikálie**

- Dream Taq DNA Polymerase 5 U/μl (Thermo Scientific)
- 10x Dream Taq Green Buffer (Thermo Scientific)
- dNTPs set (Thermo Scientific)

### **Složení reakce**

- 1,5 μl 10xPCR pufr
- 0,3 μl směs dNTPs (10mM)
- 0,15 μl primer 1 (5mM)
- 0,15 μl primer 2 (5mM)
- 0,1 μl DNA polymeráza (5 U/μl)
- 2 ul templátová DNA (25 ng/ μl)

Reakční směs se doplní PCR vodou do celkového objemu **15 μl**.

### **Pracovní postup**

Všechny práce probíhají ve sterilním boxu, aby se zabránilo možným kontaminacím chemikálií a vzorků. Pracovní plochy se před započítím práce otřou 70% etanolem. Zkumavky s chemikáliemi i se vzorky se v průběhu práce udržují v chladu (používá se chladicí stojánek). K pipetování se používají sterilní špičky s filtrem. Používají se latexové nebo nitrilové laboratorní rukavice.

- chemikálie pro PCR (10x PCR pufr, roztoky primerů, směs dNTPs) se nechají rozmrznout pozvolna v chladničce a poté se přemístí do chladicího stojánu
- pro práci s větším množstvím vzorků je výhodné používat PCR stripy (po 8 mikrozukumavkách), nebo PCR destičky (96 mikrozukumavek). Samostatné PCR mikrozukumavky jsou vhodné pouze pro malé počty vzorků.
- PCR reakce se připraví dle výše uvedeného schéma pro každý primer, či kombinaci primerů zvlášť
- připraví se potřebné množství reakční směsi (master-mix) dle počtu analyzovaných vzorků
- do označených 0,2ml mikrozukumavek (ve stripech či destičkách) se rozpipetuje reakční směs po 13 μl

- do reakční směsi v mikrozkumavkách se napipetují 2  $\mu$ l vzorku DNA tak, aby se zabránilo kontaminaci okolních mikrozkumavek vzorkem. Mikrozkumavky se uzavřou víčky, na destičky se přilepí folie.
- mikrozkumavky s reakční směsí se vloží do PCR termocykleru a spustí se teplotní program pro IRAP
- po ukončení teplotního programu lze vzorky krátkodobě uchovávat v lednici, nebo i delší dobu zamražené při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### **teplotní profil**

Amplifikace probíhá v termocykleru BIO-RAD C1000 při následujícím teplotním profilu:

- |                        |          |                       |
|------------------------|----------|-----------------------|
| • počáteční denaturace | 5 min    | 95 $^{\circ}\text{C}$ |
| • 35 cyklů:            | 35 sec   | 95 $^{\circ}\text{C}$ |
|                        | 45 sec   | 50 $^{\circ}\text{C}$ |
|                        | 3 min    | 72 $^{\circ}\text{C}$ |
| • konečná elongace     | 5 min    | 72 $^{\circ}\text{C}$ |
| • stop                 | $\infty$ | 4 $^{\circ}\text{C}$  |

### **Příprava 1,5% agarózového gelu**

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TAE pufru. Jako marker je používán Gene Ruler 100bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific). DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu. Digitalizace se provede pomocí UV-transluminátoru a digitálního fotoaparátu s nasazeným oranžovým filtrem.

### **Použité přístroje**

- elektroforéza, laboratorní váhy, zdroj elektrického napětí, pipeta, mikrovlnná trouba

### **Chemikálie**

- agaróza (Serva), 1x TAE, ethidium bromid

### **Pracovní postup**

- 1,5 g agarózy se rozmíchá ve 100 ml 1x TAE
- rozvařit roztok agarózy a TAE v mikrovlnné troubě tak, aby nebyla zřetelná žádná vlákna, přidat 10  $\mu$ l ethidium bromidu
- zchladit na cca 50  $^{\circ}\text{C}$  a nalít rozvařenou agarózu do připravené vany s „hřebínkem“, který vytvoří oddělené jamky, nalitá agaróza nesmí obsahovat žádné vzduchové bubliny
- nechat agarózu úplně zatuhnout a vyjmout hřebínek
- vložit agarózový gel do elektroforetické vany, ve které je roztok 1x TAE
- vzorky napipetovat do jednotlivých jamek– do první a poslední jamky hned za vzorky napipetovat GeneRuler 100bp Plus DNA ladder
- pokud se použije alternativní master mix bez obsahu nanášecí barvy, je tuto nutné přidat před nanášením



- připojit k napájecímu zařízení; elektroforéza probíhá 1 hodinu při konstantním napětí 150 mV
- po uplynutí této doby vyjmout gel z pufry a vyfotografovat pod UV světlem v dokumentačním zařízení

## Vyhodnocení získaných elektroforeogramů

Na digitálních záznamech výstupů z elektroforézy je sledována přítomnost a nepřítomnost fragmentů dané velikosti amplifikované LTR oblasti DNA máku. Velikosti produktů PCR pro jednotlivé primery jsou uvedeny v tabulce 6. Přítomnost (1) a nepřítomnost (0) produktů je zapisována v binárním kódu do tabulkového editoru. Ukázky separace amplifikovaných produktů na agarózovém gelu jsou umístěny v příloze.

*Tabulka 6 Velikosti fragmentů sledovaných pro vyhodnocení*

<b>Primer</b>	<b>Velikosti fragmentů</b>
IRAP 3	680bp
IRAP a5-2	550bp
IRAP a5-5	1170bp
IRAP a14-4	600bp
IRAP d10-2	1250bp
IRAP 18	550bp, 700bp, 1150bp
IRAP 3 + IRAP 9	1080bp
IRAP 5 + IRAP 9	1020bp, 1130bp
IRAP 16 + IRAP21	650bp
IRAP 19 + IRAP 21	800bp, 1060bp

## Statistické zpracování dat

Pro účely statistického hodnocení získaných dat je možné využít např. software NTSys. Vstupní data představují binární matice zapsané v tabulkovém editoru, např. MS Excel. Výstupem je výpočet genetické vzdálenosti pomocí clusterové analýzy. Výsledky jsou zobrazeny pomocí dendrogramu.

Pokud je do analýzy zahrnuto menší množství vzorků, je možné pro binarizaci dat speciální software, např. BioProfil 1D++ (Vilber Lourmar, Francie).

## Porovnání metod

Obě popisované metody jsou vhodným nástrojem pro určení odrůdové variability. Přesto každá z metod vykazuje určité výhody či nevýhody. Pokud se ovšem spojí obě metody, lze dosáhnout velmi přesných výsledků.

Pro metodu IRAP stačí k analýzám základní vybavení laboratoře. U metody SSR dochází k vyhodnocování fragmentů na genetickém analyzátoru. Ten ale není nutným vybavením laboratoře, jelikož tuto analýzu provádí specializované firmy.

*Tabulka 7 Tabulka pro porovnání metod*

	<b>SSR</b>	<b>IRAP</b>
<b>pracnost</b>	středně náročná	méně náročná
<b>finanční náročnost</b>	vysoká	nízká
<b>opakovatelnost</b>	vysoká	nízká
<b>počet ampliconů (cca)</b>	1-10	1-10
<b>potřeba znalosti sekvence genomu</b>	ano	ano
<b>reprodukovatelnost</b>	vysoká	středně vysoká
<b>požadavek na kvalitu DNA</b>	vysoký	středně vysoký
<b>vizualizace</b>	fragmentační analýza	elektroforéza
<b>dědičnost</b>	kodominantní	dominantní
<b>hojnost v genomu</b>	střední	vysoká

## Srovnání novosti postupů

Předkládanou “Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není k dispozici ucelená metodika pro hodnocení genetické variability na úrovni odrůd se zaměřením na odrůdy českého máku s využitím více molekulárních markerů. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou molekulárních markerů, komplexní vyhodnocení 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, avšak na straně druhé i své limity. Reálná interpretace molekulárních dat obvykle vyžaduje kvalifikovanou volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Využití analýzy molekulárních markerů pro popis a charakterizaci genotypů je předmětem předkládané metodiky. Výhodou postupů je možnost výběru vhodné metody, dostupné pro účely šlechtitelů podle vybavenosti laboratoře, stejně tak i možnost volby metody pro vizualizaci výsledků. V případě kombinace obou metod lze získat přesnější informace. Tyto molekulární markery jsou optimalizovány tak, aby bylo možné dostatečně určit polymorfismus na úrovni odrůd a tím dostatečně určit genetickou vzdálenost. Metodika přesně popisuje všechny postupy od přípravy materiálu k izolaci DNA tak, aby bylo dosaženo maximální čistoty, až po sestavení binárních matic a vyhodnocení pomocí konkrétního software.

## Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro genotypizaci genových zdrojů máku setého pomocí markerů SSR a IRAP v první části zahrnuje teoretických úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru rostlinného materiálu, izolaci DNA, PCR až po vyhodnocení získaných dat, které jsou standardně používané na obou pracovištích podílejících se na vyvinutí této metodiky.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro rychlou a spolehlivou detekci k účelům odlišení odrůd máku setého (*Papaver somniferum* L.). Optimalizovány byly dvě metody - IRAP a SSR. Metoda IRAP je založena na amplifikaci úseků DNA mezi retrotranspozony ohraničenými LTR. Metoda SSR je pak založena na amplifikaci úseků obsahující mikrosatelity o různé délce. Tyto metody lze pro hodnocení odrůdové diverzity použít zvlášť, ale i společně a dosáhnout tak přesnějších informací.

Ačkoliv molekulární markery nejsou dosud standardně využívány pro potřeby odlišení odrůd, mohou být vhodným doplňkem při hodnocení morfologických dat. Výhodou těchto analýz je zejména rychlost a možnost detekovat polymorfismus již v raném stádiu rostliny nedestructivní metodou a není třeba čekat až to plného vyvinutí. Analýzy nejsou ovlivňovány faktory vnitřního a vnějšího prostředí.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště a šlechtitelské stanice, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy molekulárních markerů. Na základě této metodiky lze hodnotit odrůdový polymorfismus a pomocí těchto výsledků vybírat vhodné rodičovské komponenty pro další šlechtění. Další uplatnění metody je při hodnocení čistoty dané odrůdy v průběhu šlechtění. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy Selgen, a.s.. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## **Ekonomické aspekty**

Molekulární markery popisované v této metodice mají značný ekonomický význam pro semenářské či obchodní firmy a šlechtitelská pracoviště (hodnocení pravosti a čistoty osiva, odrůdové deklarace produktu – semen, selekce genotypů při šlechtění). Vzhledem k tomu, že u většiny ekonomicky významných plodin dochází k zužování genetické diverzity, mohou právě molekulární markery velice rychle pomoci s genetickým popisem a identifikací odrůd. Výhodou těchto markerů je, že lze analyzovat mladé rostliny nedestruktivním způsobem a po rychlé analýze ponechat pouze rostliny žádaného genotypu, čímž se významně sníží náklady na dopěstování a doba šlechtění jedné odrůdy se může výrazně zkrátit. Důležitá je i rychlost analýzy, kdy pro detailní morfologickou analýzu je zapotřebí celá vegetace, výsledky molekulární analýzy jsou pak k dispozici i v řádu hodin.

Pro běžně vybavenou molekulárně-biologickou laboratoř jsou náklady spojené s analýzou IRAP markerů minimální. Stačí základní přístrojové vybavení (termocycler, elektroforetická vana, váhy, centrifuga, pipety). Cena izolačního kitu se pohybuje v částce cca 15 tis. Kč pro 250 vzorků. Tento kit lze zaměnit za mnohem levnější alternativu izolace pomocí CTAB-PVP, kde částka dosahuje přibližně třetinových nákladů. Tato metoda je sice pracnější a zdlouhavější, ale vyizolovaná DNA je velmi kvalitní o vysoké koncentraci. Další položkou je syntéza specifických primerů, kde se cena jednoho primeru pohybuje kolem 200 Kč. Ostatní položky nevyžadují nutnost specifikace a jsou používány dle zvyklostí laboratoře.

Molekulární marker SSR vyžaduje výraznější náklady na pořízení genetického analyzátoru, který se pohybuje v hodnotách od 1,4 mil Kč. Další náklady jsou spojené se syntézou značených primerů. Kdy cena jednoho značeného primeru se pohybuje od 2 do 8 tis. Kč dle použité fluorescenční barvy. Náklady na fragmentační analýzu lze ale snížit několika způsoby. Genetický analyzátor není nezbytností, jelikož analýzu si lze objednat formou služby, kde cena jedné analýzy vychází na 80 Kč. I tyto náklady lze eliminovat a to více způsoby. Lze použít 4 značené primery s odlišným fluorescenčním značením a tím náklady na služby snížit čtyřnásobně. Tato metoda je ovšem náročnější na optimalizaci. Další možností je snížit náklady na syntézu fluorescenčně značených primerů, kdy se využije metoda prodlužování forward primer o sekvenci jednoho univerzálního značeného primeru. Vyšší náklady na analýzu jsou ovšem vyváženy velmi přesnými výsledky s vysokou vypovídající schopností.

Jozová E. a kol. (2020) Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů

---

Softwarové vybavení nevyžaduje žádné specifikace. Dostatečný je klasický tabulkový editor a program vhodný pro výpočet clusterové analýzy.

## Seznam publikací předcházející metodice

- HORÁČEK, J., PAVELKOVÁ, M., 2014. Metodika využití molekulárních markerů IRAP pro popis genových zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.), Agritec, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk. ISBN: 978-80-87360-31-6
- PAVELKOVÁ, M., HORÁČEK, J., SMÝKAL, P., KALANDER, R.: Vývoj a optimalizace metody iPBS / IRAP pro hodnocení genetické diverzity máku. Úroda 9, 2012, vědecká příloha, s. 247-251. ISSN: 0139-6013

## Seznam použité 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.
- BARANYK, P. a kol. Olejniny. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2010. 206 s. ISBN 978-80-86726-38-0.
- BLACKET, M. J., ROBIN, C., GOOD, R.T., LEE, S.F., MILLERS, A.D., 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments – an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence, *Molecular Ecology Resources*, 12: 456-463.
- BUTLER, J. M., 2005. Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, Elsevier Academic Press, UK.
- CALIŠKAN, M., Genetic Diversity in Plants, Croatia: In Tech, 2012, ISBN 978-953-51-0185-7.
- ČURN, V., KUKOLÍKOVÁ, B., HAVLÍČKOVÁ, L., ŽALUDOVÁ, J., 2012. Metodika detekce a molekulární selekce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.), Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum JU ZF České Budějovice.
- DOYLE, J., 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations: Biodiversity. 2018. Rome, Dostupné z: <http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en/>.
- FESCHOTTE, C., JIANG, N., WESSLER, S.R., 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics, *Nature Reviews Genetics* 3: 329–341.
- <https://www.czso.cz/csu/czso/cris/odhady-sklizni-cervenec-2019>
- CHANG, B., LARSON, E., WHITMAN-GULIAEV, CH., 2010. The Experion System: Microfluidics-Based Automated Electrophoresis, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA.
- JOZOVÁ, E., ČURN, V., 2014. Multiplexová analýza mikrosatelitů u řepky pomocí modifikovaných fluorescenčně značených primerů. *Úroda, vědecká příloha*, 2014: (12): 191-194.

KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMÝKAL, P., SCHULMAN, A., 2010. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation, *Theor Appl Genetics*, 121:1419–30.

KALENDAR, R., TANSKANEN, J., IMMONEN, S., NEVO, E., SCHULMAN, A. H., 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by Bare-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 6603-6607.

KORIR, N. K., J. HAN, L. SHANGGUAN, Ch. WANG, E. KAYESH, Y. ZHANG a J. FANG, 2012. Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 33: 111-125.

LAHIRI, R., R. K. LAL, N. SRIVASTAVA a K. SHANKER, 2008 Genetic variability and diversity in Indian germplasm of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 8: 41-46.

LIŠKA, M. Situační a výhledová zpráva olejniny. 2019. ISBN 978-80-7434-505-0.

MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 8: 4321-4326.

NOVÁK J., 1992: Mák setý, Systematika, původ a dějiny pěstování, In: Fábry, A. (ed.), Olejiny. MZe ČR, Praha, s. 265-267.

ONDREIČKOVÁ, K., MIČIANOVÁ, V., MUCHOVÁ, D., KLČOVÁ, L., HUDCOVICOVÁ, M., HAVRLETOVÁ, M., MIHÁLIK, D., KRAIC, J, 2017. Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia*. 72(6): 587-594.

PILINSKY, S., SZOKE, A., KISS, E., HESZKY, L., FALUSI, J., 2011. Characterization of oilseed genotypes using microsatellite based DNA barcode, 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 250.

SEYFERT, A. L., M. E. A. CRISTESCU, L. FRISSE, S. SCHAACK, W. K. THOMAS a M. LYNCH, 2008. The Rate and Spectrum of Microsatellite Mutation in *Caenorhabditis elegans* and *Daphnia pulex*. *Genetics*. 178: 2113-2121.

SCHUELKE, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.

VARSHNEY, R.K., GRANER, A., SORRELLS, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications, *Trends Biotech*, 23: 48-55.

VAŠÁK, J., T. KADLEC a J. VAŠÁK, Mák. Praha, 2010. Semafor. ISBN 978-80-904011-8-1.

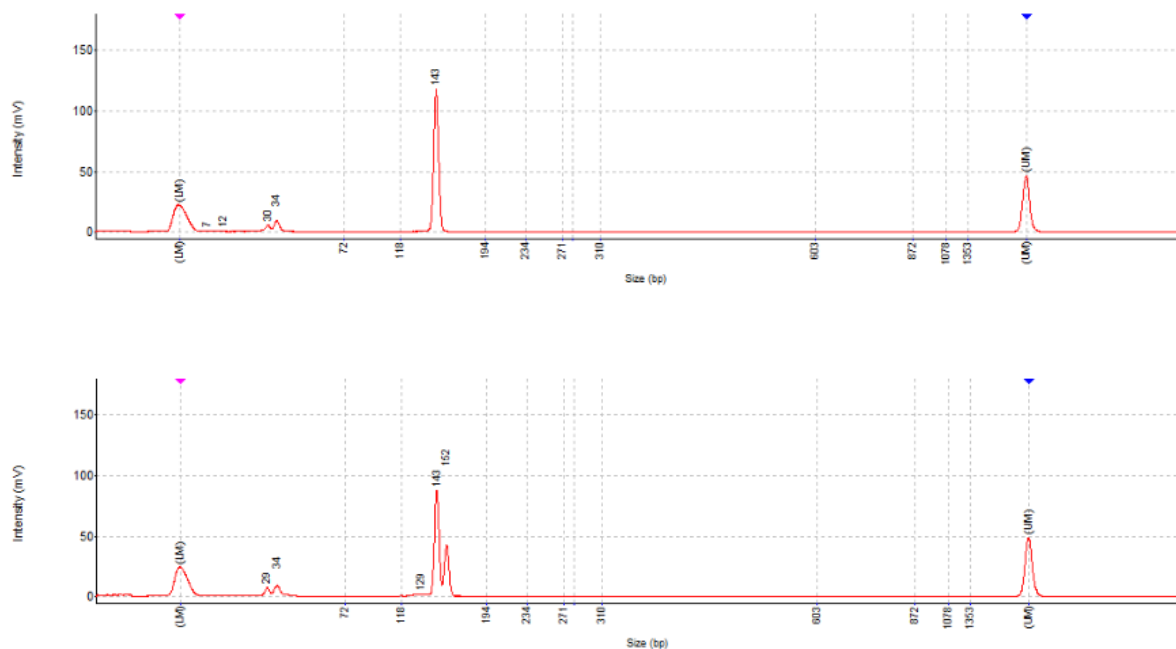
VAŠEK, J., ČÍHALOVÁ, D., MELOUNOVÁ, M., SVOBODA, P., VEJL, P., ŠTIKAROVÁ, R., VOSTRÝ, L., KUČTOVÁ, P., OVESNÁ, J., 2019. New EST-SSR Markers for Individual Genotyping of Opium Poppy Cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants*, 2020, 9(1):10.

WU, D., QIN, J., LIN, B., 2008. Electrophoretic separations on microfluids chips. *Journal of Chromatography A*, 1184: 542-559.

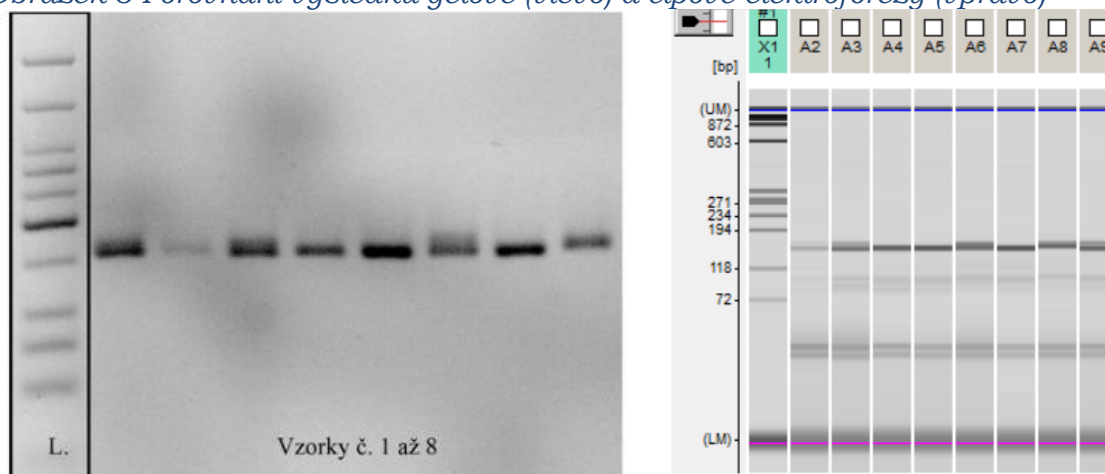
## Přílohy

### Obrazová příloha SSR

Obrázek 2 Ukázka výstupu analýzy mikrosatelitů po čipové elektroforéze



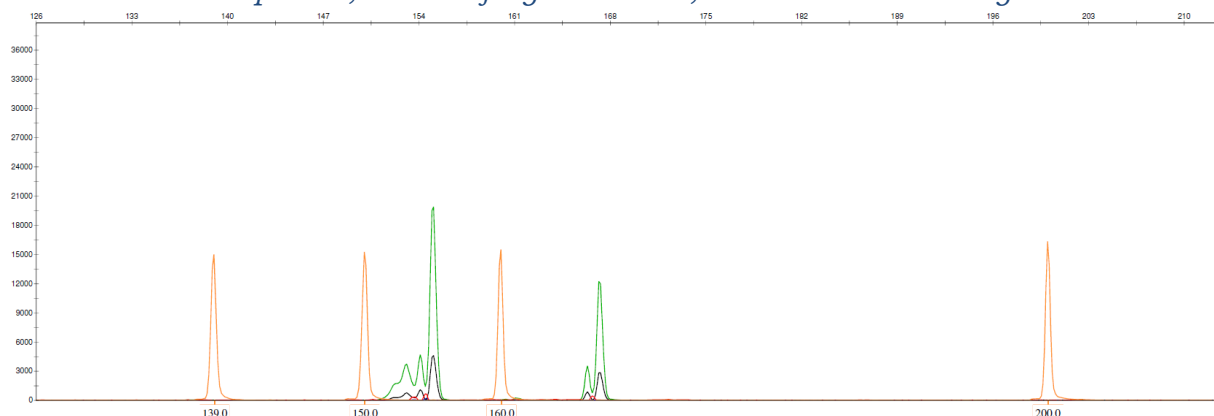
Obrázek 3 Porovnání výsledků gelové (vlevo) a čipové elektroforézy (vpravo)



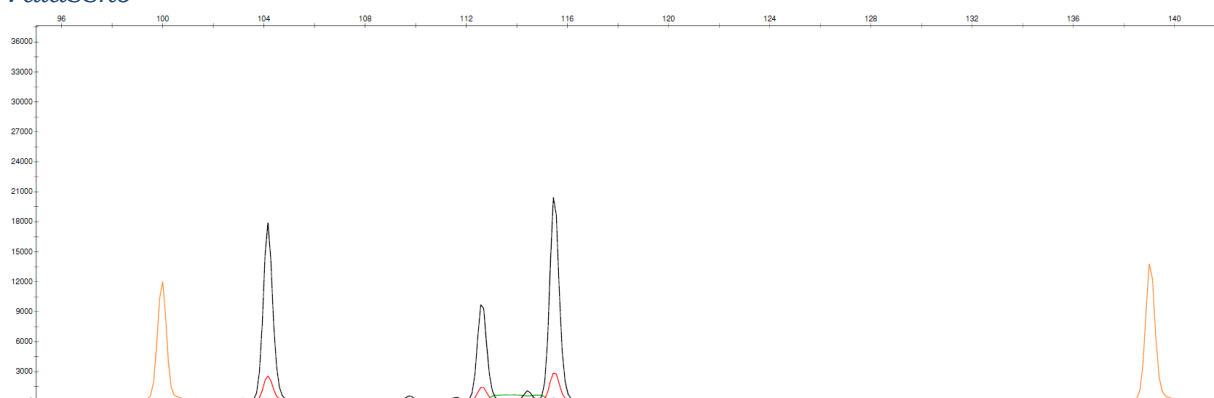


## Ukázka výstupů fragmentační analýzy zobrazené v programu GeneMapper

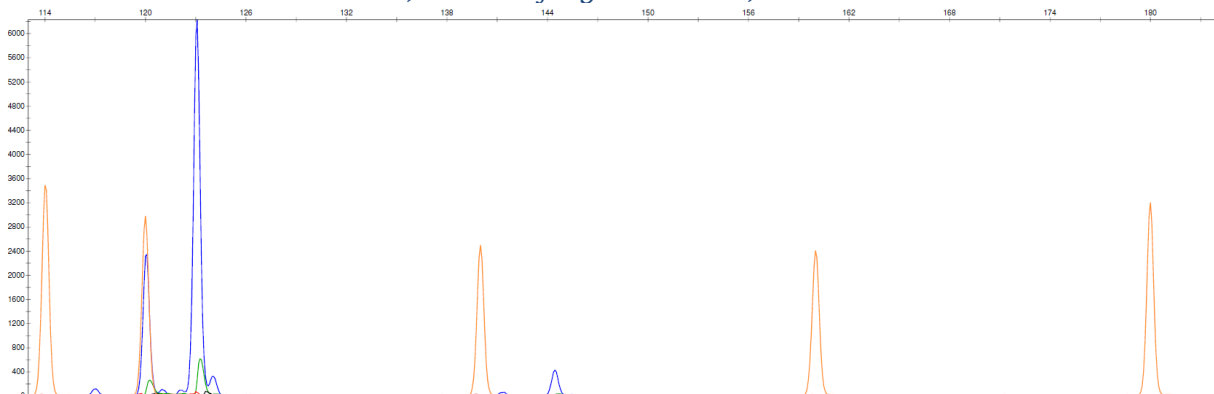
Obrázek 4 Primer *psom4*, velikost fragmentů 155, 167. Odrůda Červený Šitbořice



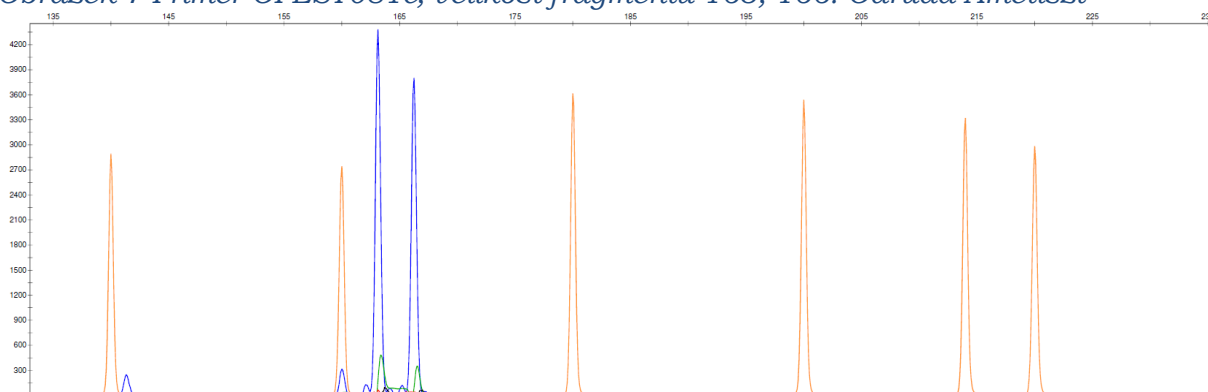
Obrázek 5 Primer *psom17*, velikost fragmentů 104, 113, 115. Odrůda Modrý Valašsko



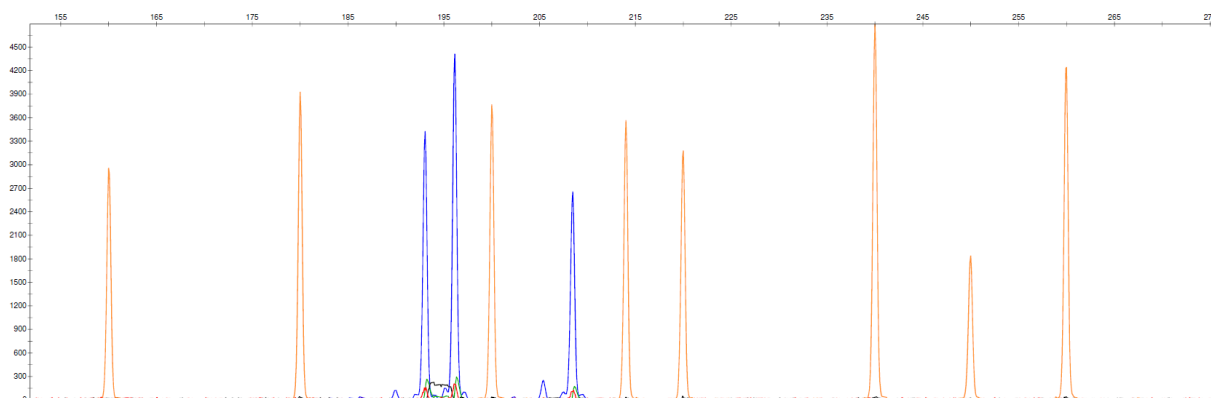
Obrázek 6 Primer *OPEST026*, velikost fragmentů 120, 124. Odrůda Ametiszt



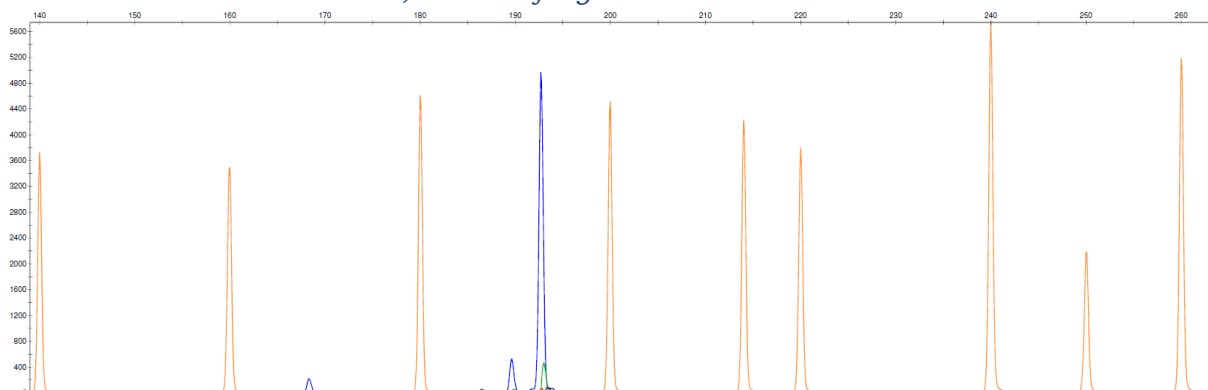
Obrázek 7 Primer OPEST081c, velikost fragmentů 163, 166. Odrůda Ametiszt



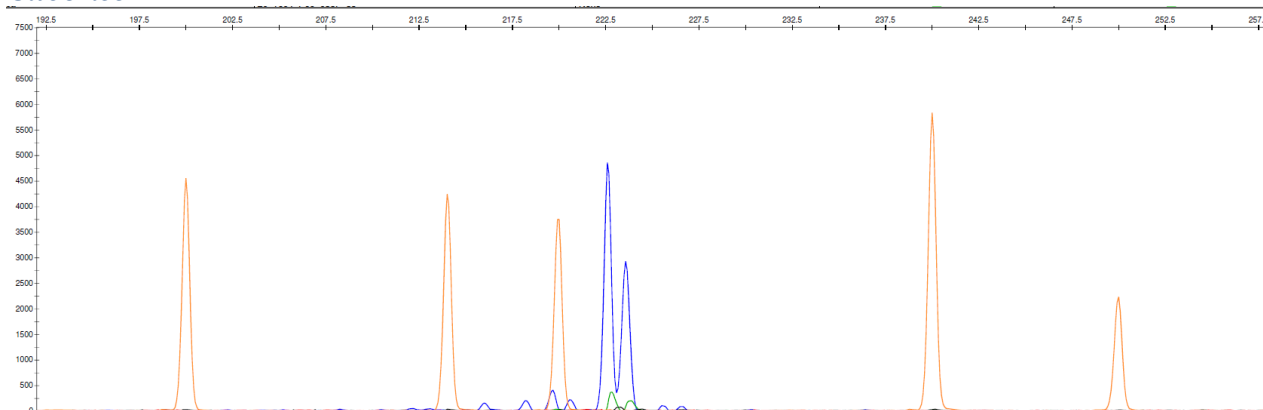
Obrázek 8 Primer OPEST053c, velikost fragmentů 193, 196, 209. Odrůda Modrý Valašsko



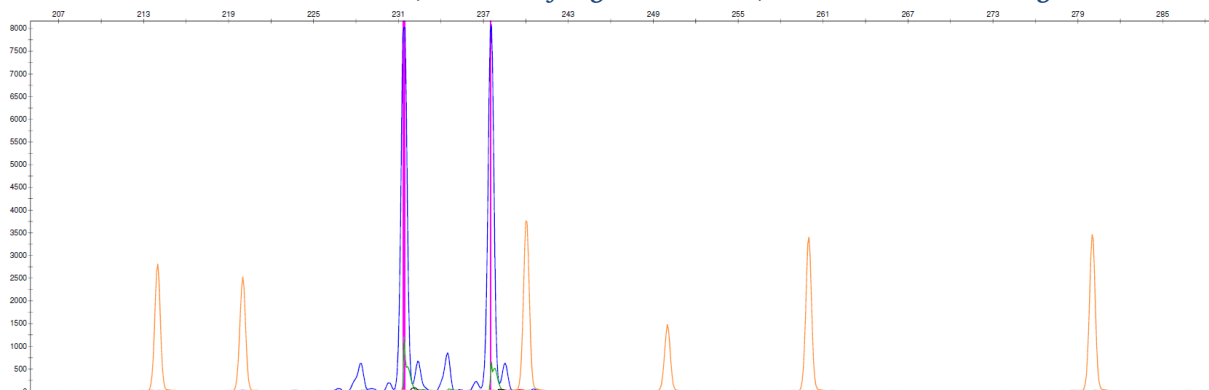
Obrázek 9 Primer OPEST106, velikost fragmentů 193. Odrůda Ametiszt



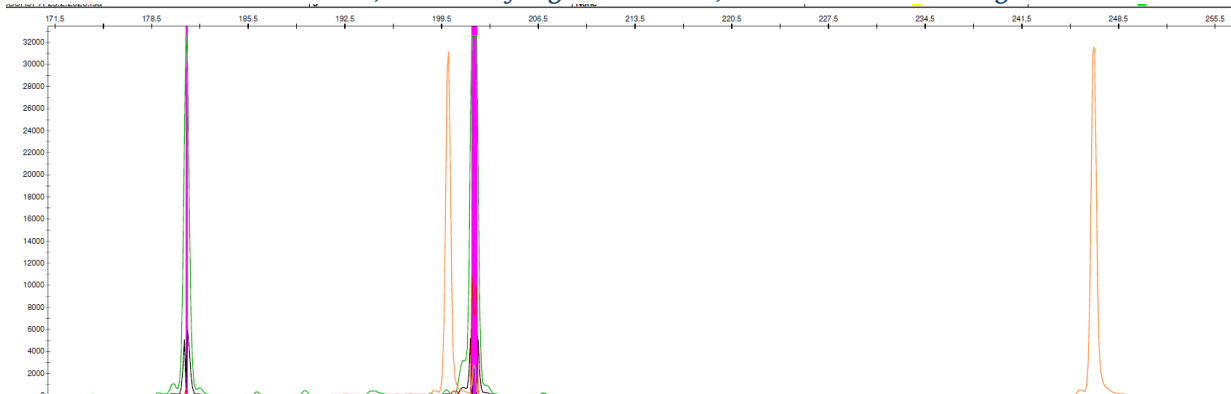
Obrázek 10 Primer OPGSSR001, velikost fragmentů 223, 224. Odrůda Červený Šitbořice



Obrázek 11 Primer OPEST061, velikost fragmentů 231, 237. Odrůda Modrý Valaško



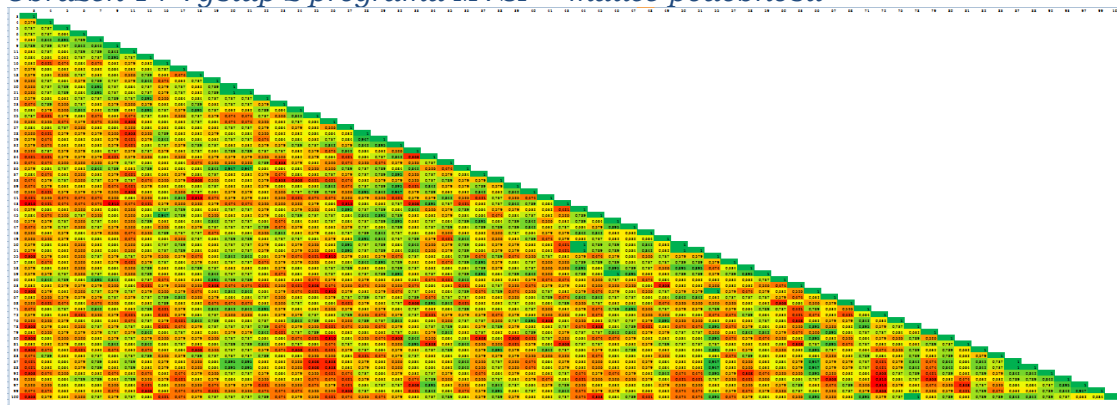
Obrázek 12 Primer SSR57, velikost fragmentů 202, 223. Odrůda Modrý Valaško



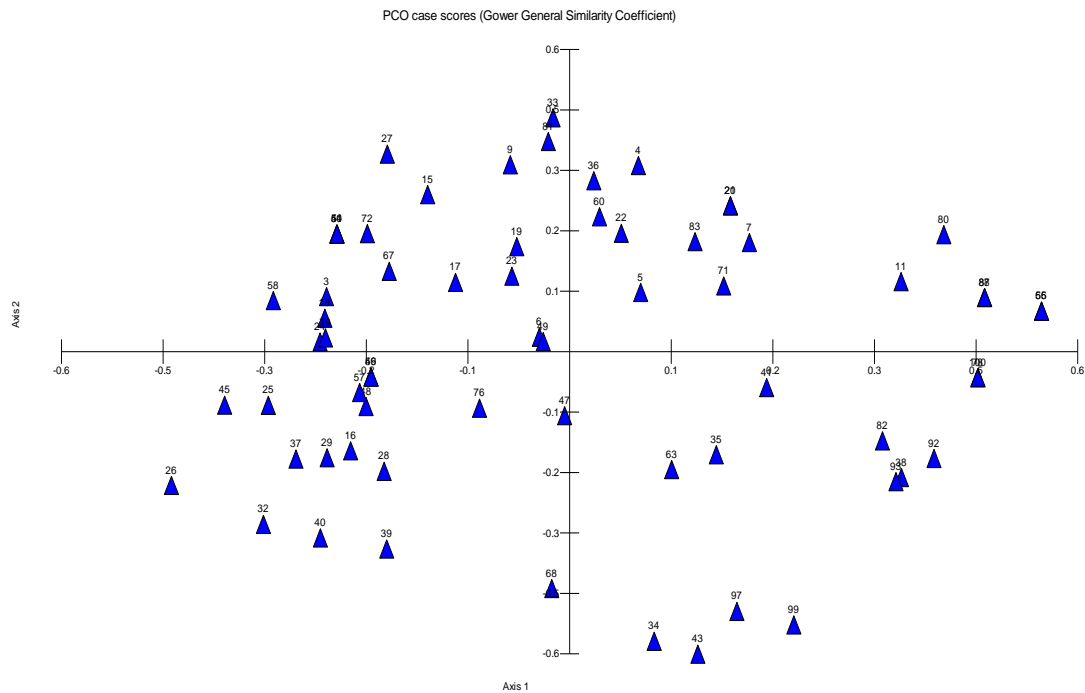
Obrázek 13 Ukázka profilů na základě FA pro vybrané odrůdy máku

	psom4	psom17	OPEST026	OPEST081c	OPEST053c	OPEST106	OPGSSR001	OPEST061	psSSR57	psSSR69
Bílý vanilkový	1 0 1 0	1 1 1 0 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 0	0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 0	0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1	1 1 0	1 1 0 0
Modrý Valašsko	1 1 1 0	1 1 1 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 0 1 0	0 1 1 0 0 0 1	0 0 1 0 1	1 1 1 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1	1 1 0	1 1 0 0
Červený Šitbořice	1 0 1 0	1 1 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0	0 1 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0	1 0 0 0 0	1 1 0	0 1 0 1
Pap.somn. var albiflora	1 1 1 1	1 1 1 1 0	1 0 0 1 0 0 0 1	0 1 0 1 1	1 1 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0	1 1 1 1 0	1 1 1	0 1 0 0
Agat	1 0 1 0	1 0 1 0 0 0	1 1 0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 0	0 1 0 0 1 1 0	0 1 0 1 0	1 0 1 1 0 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0	0 1 0 0
Ametiszt	1 0 1 0	1 1 0 0 0 0	1 1 0 0 0 0 0 0	0 1 1 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0	0 0 0 1 1 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0	0 1 0 1
Franco Pavot	1 1 1 1	1 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1 0 0 0	0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 0	0 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0	1 1 1	0 0 1 0
Botond	1 1 0 0	1 1 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 1 1	1 0 1 0

Obrázek 14 Výstup z programu MVSP – matice podobnosti

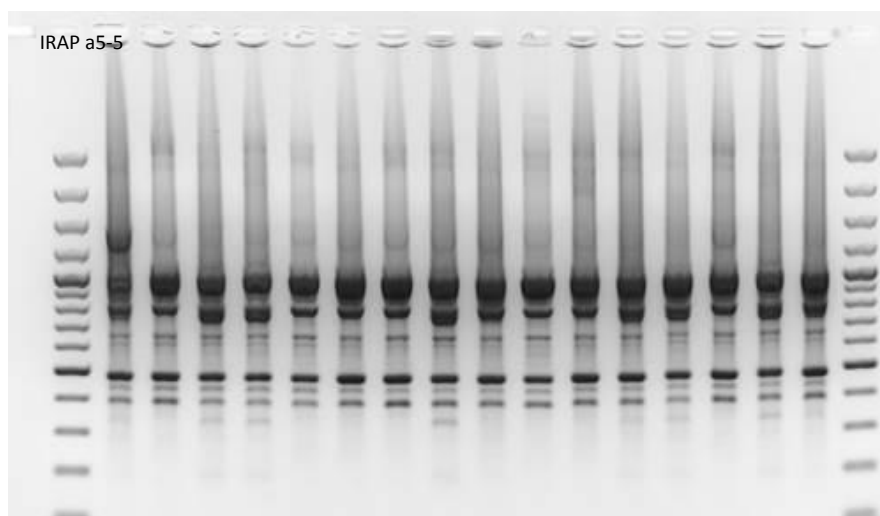
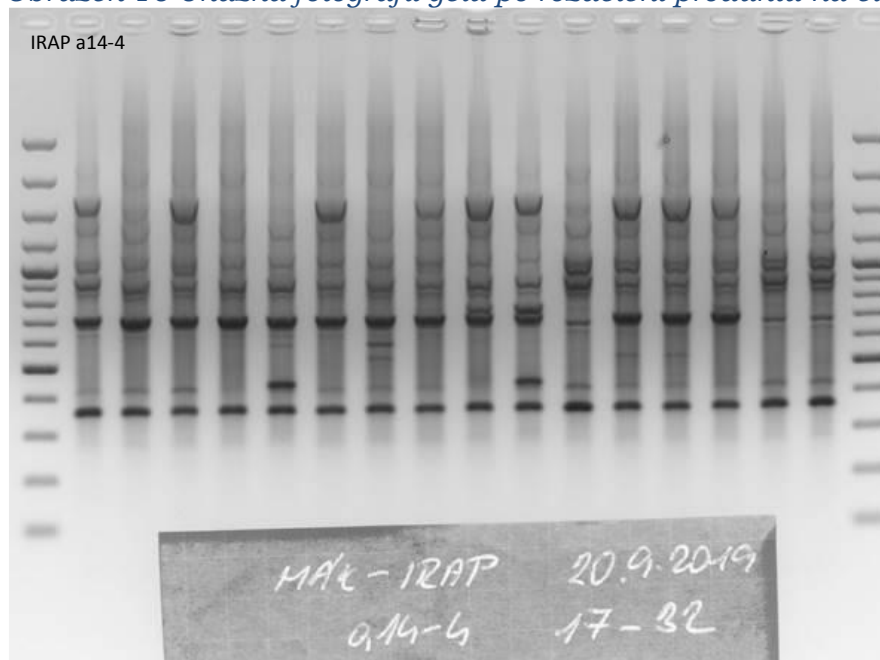


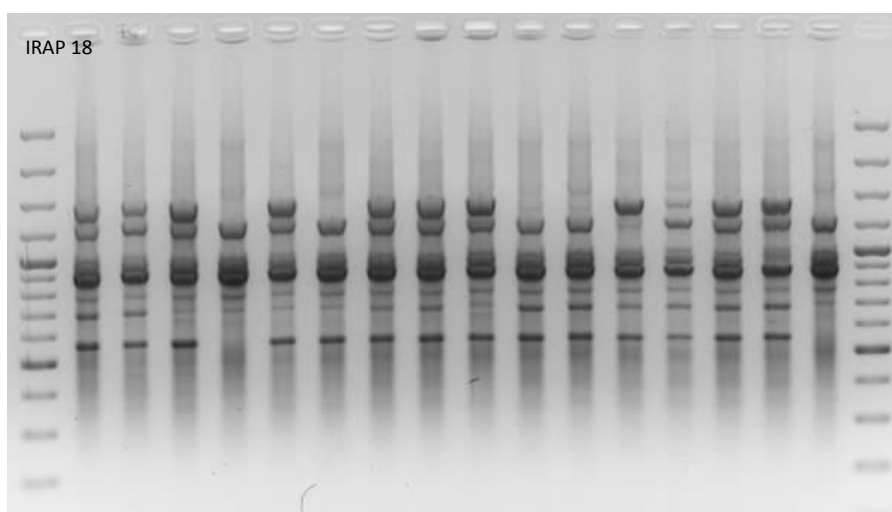
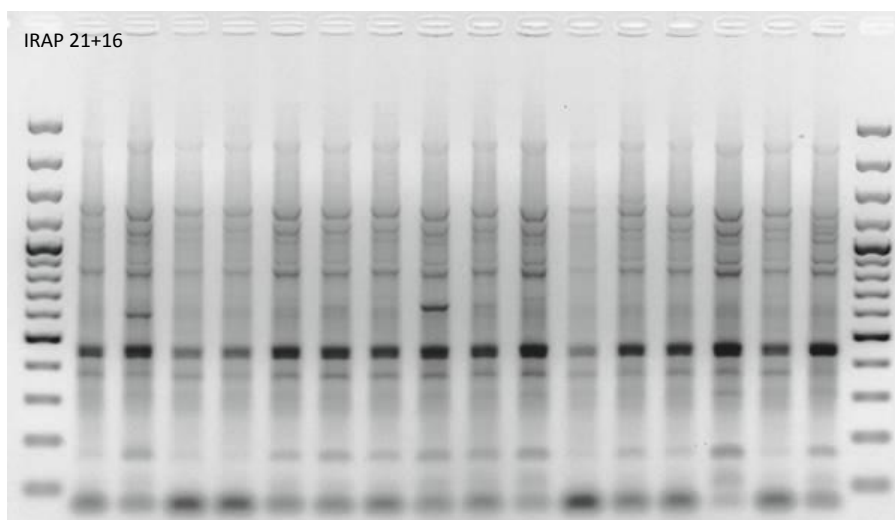
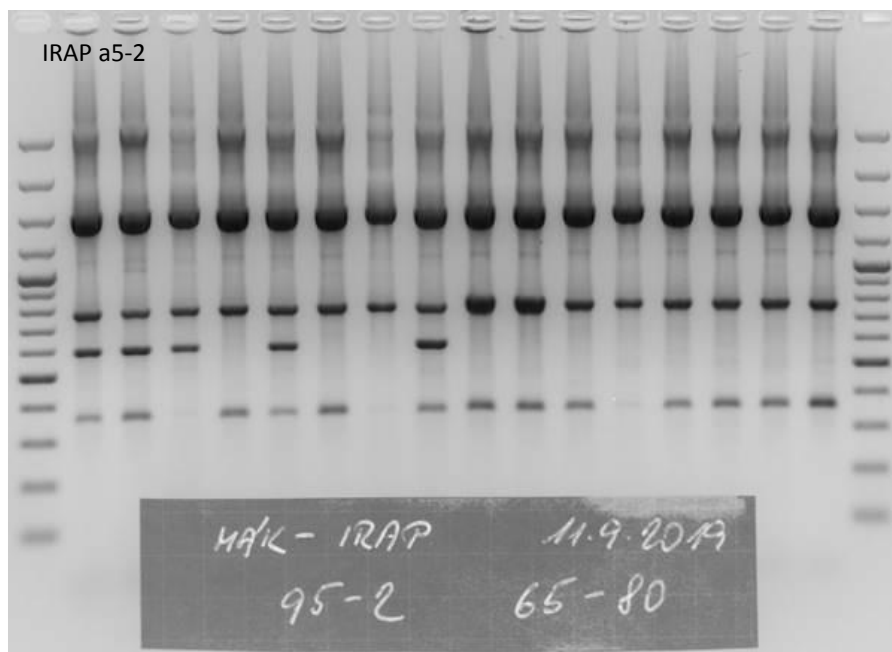
Obrázek 15 Výstup z programu MVSP – PCO analýza

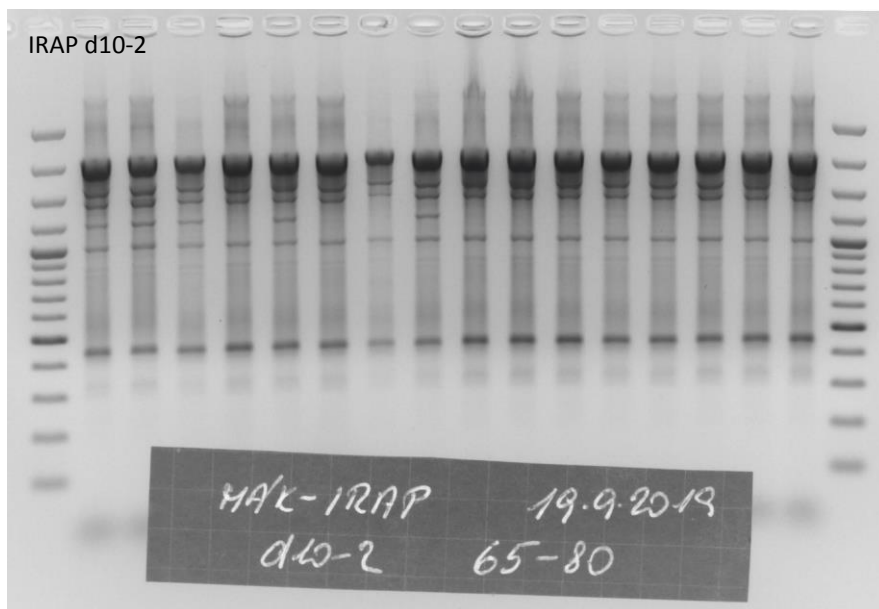
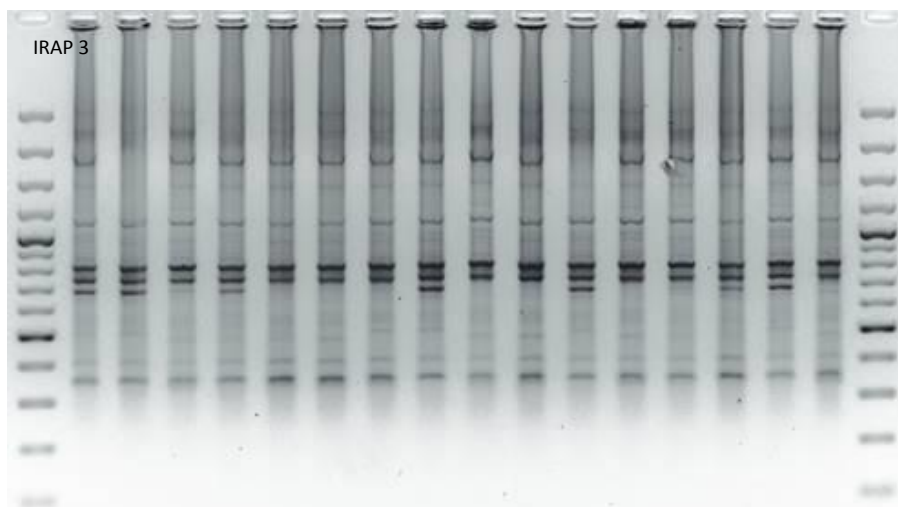


## Obrazová příloha - IRAP

Obrázek 16 Ukázka fotografií gelů po rozdělení produktů na elektroforéze

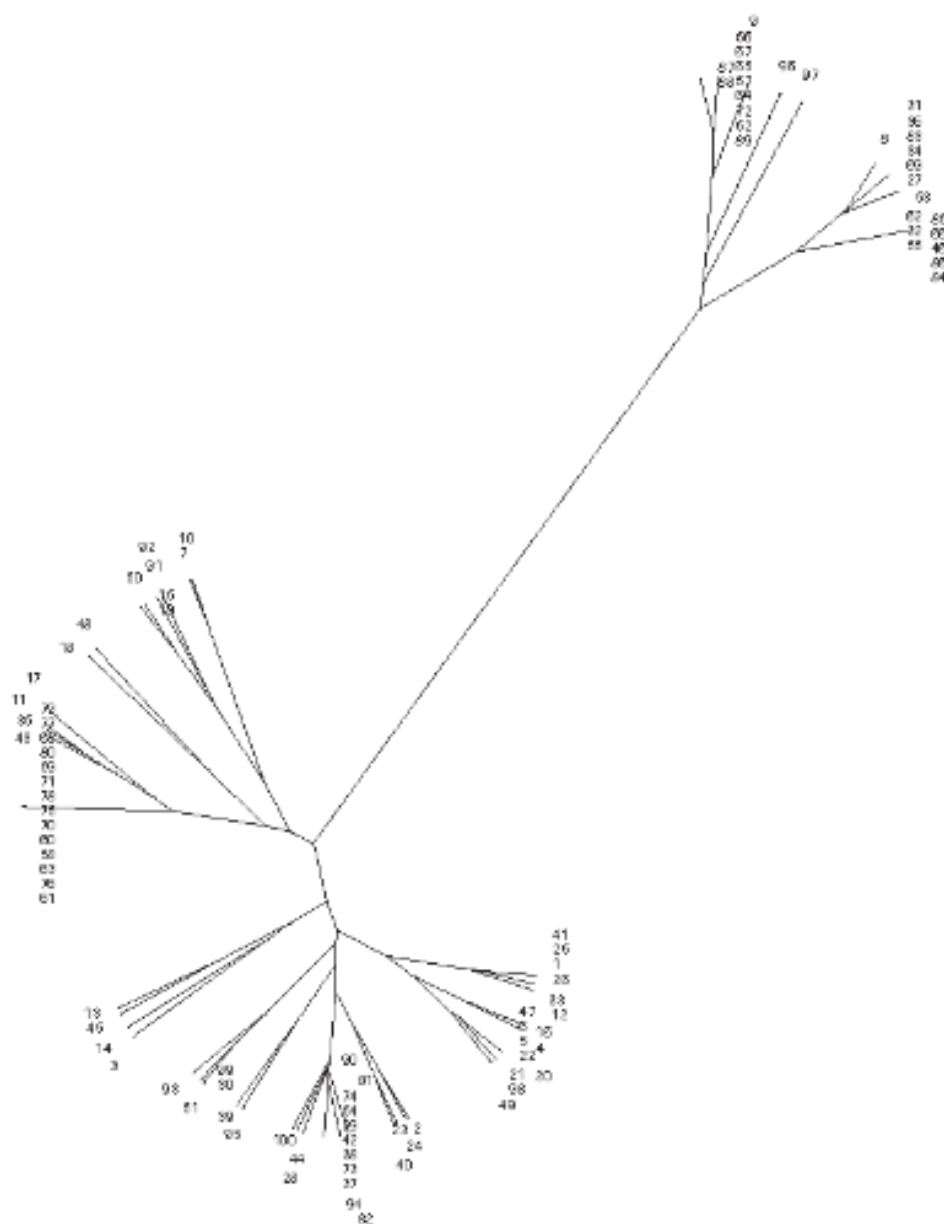






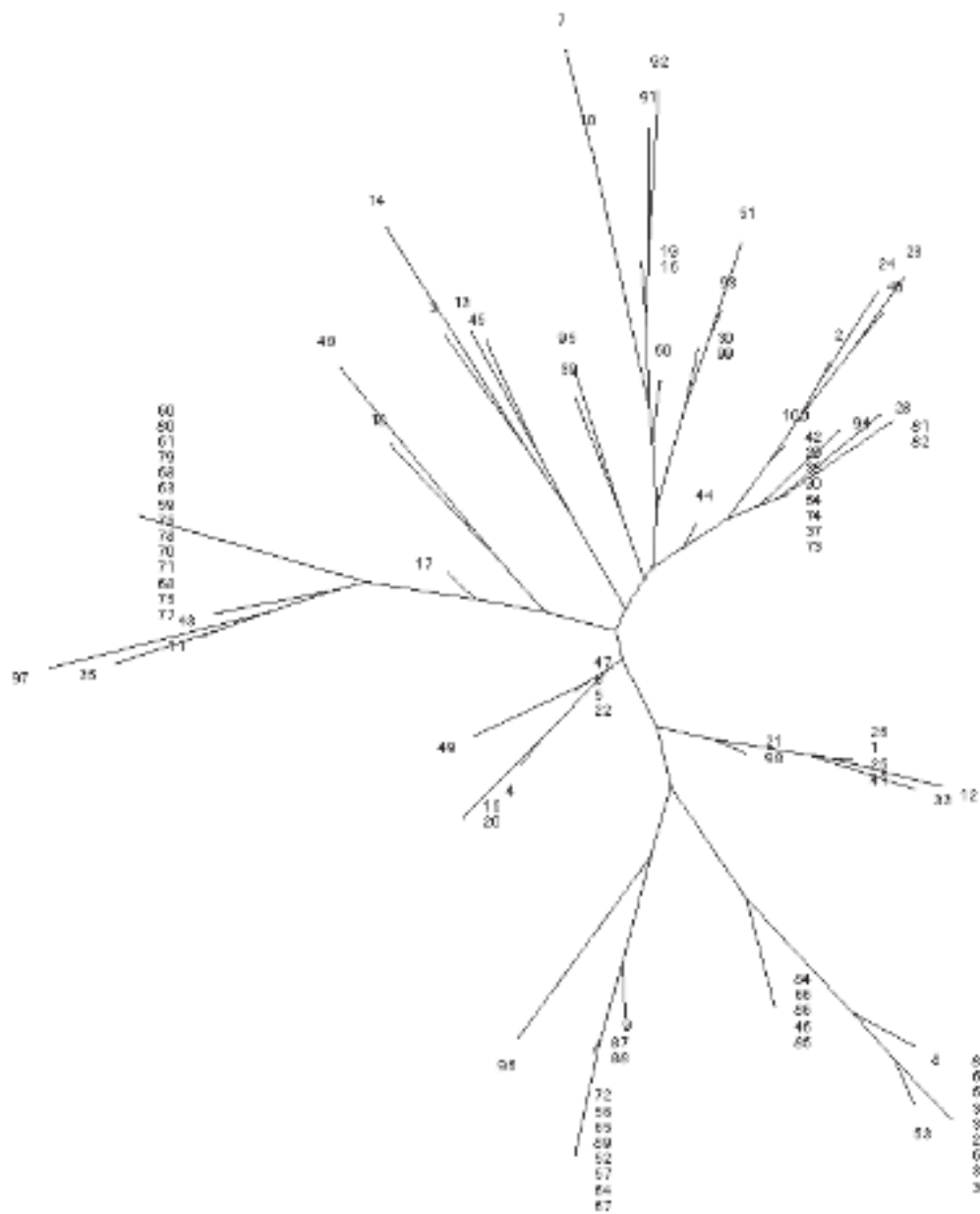
## Ukázka výsledků statistického zpracování IRAP markerů

Obrázek 17 Výsledek UPGMA analýzy





Obrázek 17 Výsledek NJ analýzy



## Použité roztoky

roztoky pro izolaci DNA

2x CTAB-PVP

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	2%	2 g	10 g	20 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
Tris	100 mM	1,21 g	6,05 g	12,114 g	+HCl = pH 8-8,2
EDTA	20 mM	0,75 g	3,723 g	7,446 g	+NaOH = pH 7,8-8
NaCl	1,4 M	8,2 g	40,915 g	81,83 g	
PVP	1%	1 g	5 g	10 g	
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

5% CTAB

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	5%	5 g	25 g	50 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
NaCl	0,35 M	2,04 g	10,27 g	20,4 g	
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

1x TE pufr

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	10 mM	0,121 g	0,605 g	1,2114 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C +HCl = pH 8-8,2
EDTA	1 mM	0,03723 g	0,1865 g	0,3723 g	+NaOH = pH 7,8-8
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

3M octan sodný

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
octan sodný	3 M	40,8 g	27 g	408 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit + ledová kys. octová pH=5,2
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

*pufrů pro elektroforézu*

5x TBE

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	0,445 M	5,4 g	27 g	54 g	
kys. boritá	0,445 M	2,75 g	13,75	27,5 g	
EDTA	0,5 mM	2 ml	10 ml	20 ml	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

50x TAE

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	2 M	24,2 g	121 g	242 g	doplnit vodou do $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit
kys. octová	1 M	5,71 ml	28,55 ml	57,1 ml	
EDTA	50 mM	1,86 g	9,3 g	18,6 g	pH=8
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

*příprava agarózového gelu*

1,5% v 1xTAE

objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [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

3% v 1xTBE

objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [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

Název: Jozová E. a kol. (2020): Metodika pro genotypizaci genetických zdrojů máku setého (*Papaver somniferum* L.) pomocí SSR a IRAP markerů

Autorský kolektiv: Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Ing. Martina Stará

Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studentská 1668

370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, dopisem ze dne 27.10.2020 (č.j. UKZUZ 199189/2020), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [vondre01@zf.jcu.cz](mailto:vondre01@zf.jcu.cz)

ISBN: 978-80-7394-826-9

ISBN 978-80-7394-826-9

