JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D

Diplomová práce

Molekulární charakterizace a hodnocení genetické diverzity genových zdrojů máku

Autor diplomové práce: Bc. Martina Stará
Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Jozová, Ph.D.
Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Akademický rok: **2017/2018**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Martina STARÁ**
Osobní číslo:	**Z17079**
Studijní program:	**N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor:	**Zemědělské biotechnologie**
Název tématu:	**Molekulární charakterizace a hodnocení genetické diverzity genových zdrojů maku**
Zadávající katedra:	**Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Zásady pro vypracování:

Cíl práce: Hlavním cílem diplomové práce je optimalizovat metodu vhodnou pro studium genetické diverzity u máku. Práce bude rozdělena na dvě části skládající se z literárního přehledu a experimentální části s praktickým využitím výsledků.

1) **Úvod** - stručný nástin molekulárních technik a jejich významu pro hodnocení a management genetických zdrojů rostlin.
2) **Literární přehled** - metody DNA fingerprintingu, zhodnocení významu molekulárních markerů pro účely popisu a identifikace odrůd a genetických zdrojů, základní aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin.
3) **Cíl práce** - definice hypotéz a cílů práce.
4) **Materiál a metody** - popis a charakterizace analyzovaných genetických zdrojů, izolace DNA a analýza molekulárních markerů.
5) **Výsledky** - vyhodnocení profilů molekulárních markerů, výsledky analýz molekulárních markerů, vyhodnocení elektroforetických a fragmentačních dat, vyhodnocení stability DNA profilů, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.
6) **Diskuze** - porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.
7) **Závěr** - přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.
8) **Seznam použité literatury** - v abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197)
9) **Obsah** - uvedení jednotlivých kapitol práce

Rozsah grafických prací:	**10 - 15 stran**
Rozsah pracovní zprávy:	**40 - 50 stran**
Forma zpracování diplomové práce:	**tištěná**

Seznam odborné literatury:

Gustavo Caetano-Anollés, Pater M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley and Sons, Inc., New York
Avis J.C. (2004): Molecular Markers, Natural History, and Evolution. - Sinauer Assocates, London
Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. - CRC Press, Boca Raton, USA
Koh H.J. et al. (2015): Current Technologies in Plant Molecular Breeding. Springer, New York
Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts

Vedoucí diplomové práce:	**Ing. Eva Jozová, Ph.D.** Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Konzultant diplomové práce:	**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.** Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Datum zadání diplomové práce:	**28. února 2018**
Termín odevzdání diplomové práce:	**15. dubna 2019**

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Molekulární charakterizace a hodnocení genetické diverzity genových zdrojů máku“ vypracovala samostatně na základě svých výsledků a použila jen materiály, které uvádím v seznamu použité literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 2019

Podpis

Poděkování

V úvodu práce bych ráda poděkovala vedoucí mé práce Ing. Evě Jozové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a pomoci při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry genetiky a speciální produkce rostlinné za pomoc při práci v laboratoři.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem genových zdrojů máku setého *(Papaver somniferum* L.*)* pomocí SSR analýzy. Celkem bylo hodnoceno 85 vzorků. DNA byla izolována ze sušeného, směsného vzorku vypěstovaného z osiva, poskytnutého VÚO Opava, pomocí modifikované metody CTAB podle Doyle and Doyle (1990). Pro analýzu bylo vybráno šest SSR primerů, vizualizace probíhala pomocí čipové elektroforézy. Byla provedena optimalizace PCR reakce s fluorescenčně značeným primerem pro fragmentační analýzu. Data z čipové elektroforézy byla vyhodnocena v programu MVSP za použití PCO analýzy. Nadále byla vypočtena matice podobnosti, ze které bylo zřejmé, že vzorky vykazují vysokou genetickou variabilitu. Výsledky matice podobnosti byly poskytnuty šlechtitelům jako podklad pro další šlechtění.

Klíčová slova: mák setý *(Papaver somniferum* L.*)*, mikrosatelity, molekulární markery

Summary

The thesis deals with the study genetic diversity of poppies (*Papaver somniferum* L.) by SSR analysis. Altogether, 85 samples of poppies were evaluated. DNA was isolated from dried, mixed samples grown from seed using a modified CTAB method by Doyle and Doyle (1990). The seeds were provided by VÚO Opava. Six SSR primers were selected for the analysis and visualization was performed using chip electrophoresis. The PCR reaction was optimized with fluorescently labeled primer for fragmentation analysis. Chip electrophoresis was evaluated in MVSP using PCO analysis. The similarity matrix was further calculated and the samples showed hight genetic variability. The results of similarity matrix were provided to breeders as a basis for further breeding.

Keywords: poppy *(Papaver somniferum* L.*)*, microsatellites, molecular markers

Grantová podpora

Tato diplomová práce byla vypracována za podpory projektu NAZV QK1810891.

Obsah

1. Úvod 9
2. Literární přehled 10
2.1 Biologická klasifikace 10
2.2 Původ máku setého 10
2.3 Historie máku setého 11
2.4 Pěstování máku setého 12
2.4.1 Pěstitelské plochy máku na území ČR v roce 2018 12
2.4.2 Ve světě 13
2.5 Šlechtění máku setého 13
2.5.1 Historie šlechtění 13
2.5.2 Šlechtitelské cíle 14
2.6 Odrůdy máku setého 16
2.7 Biodiverzita 20
2.8 Molekulární markery 21
2.8.1 DNA markery založené na principu hybridizace 24
2.8.2 Markery založené na principu PCR 25
2.8.3 Vyhodnocování molekulárních markerů 30
3. Hypotézy a cíle práce 32
4. Materiál a metodika 33
4.2 Izolace DNA 35
4.2.1 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP 35
4.3 Kontrola kvality DNA na agarosovém gelu 36
4.4 Kontrola koncentrace izolované DNA 38
4.5 PCR 39
4.5.1 Optimalizace složení PCR reakce 39
4.5.2 Gelová elektroforéza 40
4.5.3 Čipová elektroforéza 41
4.5.4 Optimalizace fragmentační analýzy 41
5. Výsledky práce 43
5.1 Kontrola kvality a kvantity izolované DNA 43
5.2 Testování primerů vhodných pro analýzu SSR u máku setého 44
5.2.1 Optimalizace pomocí gelové elektroforézy 44

5.2.2 Výsledky z čipové elektroforézy 46
5.2.3 Výsledky optimalizace fragmentační analýzy 47
5.3 Výsledky SSR analýzy 49
6. Diskuse 54
7. Závěr 57
8. Zdroje 59

1. Úvod

Pěstování máku má v našich zemích dlouholetou tradici. V ČR je mák třetí nejpěstovanější olejninou s osevní plochou kolem 30 tisíc hektarů. Je to plodina poskytující všestranné využití. Poskytuje olejnatá semena s dobrými dietetickými vlastnostmi, široce používanými především pro přípravu makového pečiva. Makovina, ve které jsou obsaženy alkaloidy, se využívá ve farmaceutickém průmyslu. V makovině z potravinářského máku pěstovaného v České republice, je obsah alkaloidů velmi nízký.

Ve světě se pěstuje převážně mák s vysokým podílem alkaloidů v makovině. Hlavními státy legálně pěstující opiový mák jsou Indie, Turecko a Tasmánie. Jedním z největších výrobců legálního opia je Austrálie. Mezi státy s největšími plochami nelegálně pěstovaného opiové máku patří Pákistán, Barma, Thajsko a Afghánistán.

Díky intenzivnímu šlechtění dochází ke snižování genetické diverzity u zemědělských plodin. Pro šlechtitele je však existence rozsáhlého genofondu nezbytnou součástí jejich práce. Variabilita uvnitř druhu je možností pro vhodný výběr požadovaných vlastností, které šlechtitel zahrne do šlechtění s cílem zlepšení určité plodiny. Do šlechtění jsou jednak vybírány vhodné genotypy, jindy je vytvářena nová genetická rozmanitost prostřednictvím různých metod např. hybridizací, mutací nebo genetickou transformací.

Dříve byly pro odhad genetické variability využívány morfologické znaky. Dnes se nejčastěji využívají molekulární markery, detekující DNA polymorfismy mezi jednotlivými odrůdami zemědělských plodin.

K největšímu rozvoji využití DNA markerů došlo v posledních desetiletích. Mezi tyto markery patří například RFLP a microarray čipy. Objevení PCR reakce, chemikem Kary Mullisem v roce 1983, a její rozvoj přispěl ke vzniku mnoha dalších molekulárních metod jako např. RAPD, AFLP, SNP, ISSR nebo metody SSR.

Analýza mikrosatelitů se přibližně od 90. let stala velmi často využívanou metodou při analýze rodičovských rostlin, identifikaci klonů, v populačně-genetických studiích, hybridizaci a při analýze genetické variability blízce příbuzných druhů.

2. Literární přehled

2.1 Biologická klasifikace

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) patří do čeledi makovitých (*Papaveraceae*). Řadíme ho do rodu mák (*Papaver*), který je rozčleněn do 11 skupin obsahující přibližně 120 druhů. Tento rod je rozšířen v Evropě, Asii, severní a jižní části Afriky a Severní Americe. Největší počet druhů je rozšířen ve Středomoří.

V České republice se kromě máku setého můžeme setkat s výskytem dalších druhů máku. Nejčastěji se vyskytujícím druhem je mák vlčí (*Papaver rhoeas*), který řadíme mezi významné plevelné druhy. Mezi další vyskytující se druhy patří například 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*) (Baranyk a kol., 2010).

Zařazení druhu:

Říše:	*Plantae* (Rostliny)
Oddělení:	*Magnoliophyta* (Krytosemenné)
Třída:	*Rosopsida* (Vyšší dvouděložné)
Řád:	*Ranunculales* (Pryskyřníkotvaré)
Čeleď:	*Papaveraceae* (Makovité)
Rod:	*Papaver* (mák)
Druh:	*Papaver somniferum* L. (mák setý) (Jahodář, 2006)

2.2 Původ máku setého

Mák setý je stará kulturní plodina, která se v přírodě nevyskytuje jako planě rostoucí a jejíž původ není zcela znám (Novák, 1992). Vašák (2010) uvádí původ ve východoasijském (Čína, Nepál) a předoasijském (Malá Asie, Zakavkazí, Írán, vysočiny Turkménie) genovém centru. Bechyně (2001) uvádí, že vznikl z diploidního planého druhu *Papaver setigerum* DC, který se vyskytuje ve Středomoří. Dle počtu chromozomů obou forem je možné je považovat za dvě subspecie téhož druhu. Základní počet chromozomů u *Papaver somniferum* n = 11. U obou druhů se vyskytují jak diploidní jedinci (2n = 22), tak tetraploidní jedinci (2n = 44). Mimo karyologický charakter podporují závěr o popsaném původu i některé morfologické vlastnosti i znaky. Diploidní formy se od tetraploidních

v mnoha znacích neliší (Bechyně, 2001). Velikost genomu u *Papaver somniferum* se uvádí 2,72Gb (GUO et al., 2018).

2.3 Historie máku setého

Nejstarší zbytky tobolek a semen byly nalezeny ve Švýcarsku a jižní Francii a pocházely z období neolitu. Starověké civilizace, mezi něž patří Římané, Řekové, Egypťané a Sumerové, znali tišící účinky opia a využívali je jako léčivo. První psaná zmínka o máku byla nalezena na hliněných destičkách v duchovním centru Sumerů, kteří mák nazývali *Hul Gil* – květina radosti (Nožina, 2001). Dále bylo toto využití rozšířeno do Indie a Číny. V 19. století bylo zneužívání opia v Číně velmi rozšířené. Následně byl dovoz opia čínskou vládou zakázán. Tento zákaz však rozpoutal tzv. opiové války s Anglií, které Čína prohrála a musela dovoz opia znovu povolit (Baranyk a kol., 2010). V Evropských zemích nebylo opium dlouho známo. Mák zde byl pěstován na produkci semen a jako zahradní rostlina. Jako lék se opium začalo používat v 16. století švýcarský alchymista, astrolog a lékař Paracelsus (Vašák a kol., 2010).

Problém zneužívání opia se začal řešit na počátku 20. století. V roce 1909 byla stanovena mezinárodní komise pro opium a v roce 1914 se 34 států domluvilo, že učiní všechny potřebné kroky pro omezení výroby a dovozu této drogy. Hlavní problém však představovali farmáři z chudých zemí, pro které se produkce opia vyplácela více, než pěstování jiných tamějších plodin. Mezi tyto státy patří Indie, Pákistán, Afghánistán, Thajsko, Laos a území Barmy. Přes snahu se tedy produkci a nezákonnou distribuci opia nepodařilo potlačit a přetrvává dodnes (Baranyk a kol., 2010).

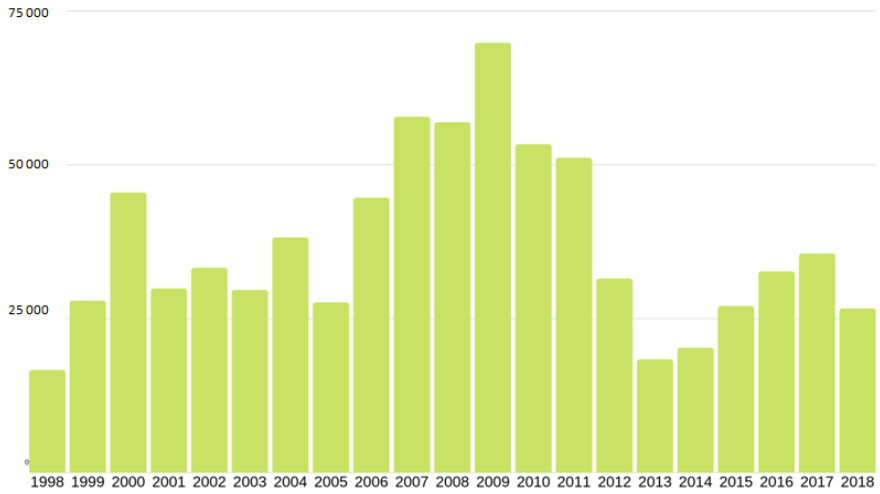
Pěstování a využití máku setého má ve střední Evropě dlouholetou tradici. Pěstování bylo rozšířené hlavně u slovanských národů. Uvádí se, že nejvíce máku bylo pěstováno na území Slovenska. V podmínkách střední Evropy je mák tradiční olejninou (Fejér, 2015). Znalost máku setého na území České republiky, jak uvádí je datována dle nálezu z Ostrova na Tachovsku již od 8. stol. př. n. l. (Newton, 2007).

2.4 Pěstování máku setého

Česká republika patří dlouhodobě mezi hlavní světové pěstitele máku pro potravinářské účely. Více než 90% tuzemské produkce je exportováno do zahraničí. Především do slovanských zemí (Rusko, Polsko, Bělorusko, Ukrajina) a do zemí, které jsou ovlivněné slovanskou kuchyní (Zukalová a kol., 2009).

2.4.1 Pěstitelské plochy máku na území ČR v roce 2018

V tomto období bylo sklizeno celkové množství semene máku 13 666 tun. Celková osevní plocha byla 26 608 hektarů. Průměrný výnos dosáhl 0,51 tuny na hektar. Český mák je vzhledem ke své výtečné kvalitě a cenové dostupnosti dobře hodnocen a často také preferován před máky z jiných zemí, např. z Turecka, Maďarska, Polska či Holandska. Vývoz sklizeného makového semene se nejvíce realizuje v období od srpna (září) do prosince daného roku. V tomto období se obvykle vyveze až 2/3 z celkového objemu máku určeného pro export. Zbývající část objemu máku pro export se vyváží průběžně v období mezi lednem a červnem následujícího roku (Liška, 2018). V grafu číslo 1 jsou zaznamenány sklizňové plochy máku setého za období 1998-2018.



Graf č. 1 Vývoj sklizňových ploch máku setého v období 1998-2018 (ha)

Součástí pěstování máku setého je tzv. maková sláma – makovina (makovice s max. 15 cm stonku). Makovina je významnou surovinou pro farmaceutický průmysl, kde složí k výrobě morfinu. V České republice se maková sláma nezpracovává, ale vyváží se (Liška, 2017).

2.4.2 Ve světě

V současné době se mák setý pěstuje téměř po celém světě. Mák opiový je pěstován převážně v podhorských oblastech zemí subtropického a tropického pásu. Mezi nejvýznamnější pěstitele opiového máku řadíme Turecko, Indii, Pákistán a Makedonii. Například Turecko dříve produkovalo legální i nelegální opium, na začátku tisíciletí byla produkce opia v Turecku zakázána, avšak mák zde může být pěstován pro semeno a makovinu (Hlava a kol., 2002). Centrum pěstování máku je ve slovanských zemích a Turecku. Celosvětová produkce máku se odhaduje na 190 tis. ha (Vašák a kol., 2010).

Většina států v Evropě uplatňuje omezení při pěstování máku. Jedná se o pěstování pouze nízkomorfinových odrůd. Mezi tyto státy patří Polsko (plocha 3 tis. ha), Německo (plocha 400 ha), Ukrajina (plocha 15 tis. ha) a Slovensko (plocha 3 tis. ha). V těchto státech platí i další omezení, včetně licencí na produkci. Paradoxně Slovensko, stát s dlouholetou historií pěstování máku, se stalo velkým dovozcem máku z České republiky (Vašák a kol., 2010).

2. 5 Šlechtění máku setého

Mák setý patří mezi fakultativně cizosprašné rostliny. K dozrání pylu dochází již v uzavřených poupatech, což znamená, že k oplození dojde již v poupěti. Po vykvetení dochází k doopylení, jehož podíl se uvádí mezi 10 – 30%. Míra cizosprášení je ovlivněn podmínkami v době kvetení – teplotou, vlhkostí, přítomností opylovačů. Opylení větrem má pouze malý podíl cizosprášení. Uvádí se, že podíl cizosprášení je ovlivněn i barvou květu (včely upřednostňují bílý květ před fialovým). Možnost cizosprášení je potřebné zohlednit při šlechtitelské práci zabezpečením izolace rostlin za účelem samosprášení (Bechyně, 2001; Vašák a kol., 2010).

2.5.1 Historie šlechtění

Počátek systematického šlechtění máku je datován do 30. let 20. století. V této době byly pěstovány krajové odrůdy s různou barvou semen. Při šlechtění byl kladen důraz na zvýšení výnosu a jednobarevnost semen. Základem pro prvopočáteční šlechtění posloužili krajové odrůdy jako Dregerův stříbrošedý (Chlumec nad Cidlinou), Freudlův Libverdský nepukavý (Děčín), Vyškovský (Vyškov), Zborovický modrosemenný (Zborovice) a Karlův růžokvětý (Plzeň).

Tyto krajové odrůdy daly vzniknout novým odrůdám, jakými byly Dvorského Azur (1928), Hanácký modrý (1934) a Dubský stříbrnošedý (1944) s vyšším obsahem morfinu (Almanach, 2000).

V roce 1957 začala další etapa intenzivního šlechtění s využitím cíleného křížení. Jako rodičovské rostliny byly využity kromě domácích odrůd také odrůdy zahraniční. Mezi odrůdy vyšlechtěné v tomto období patří například Modran (ŠS Chlumec nad Cidlinou a ŠS Čelachovice na Hané). Poslední registrovaná odrůda vyšlechtěná v tomto období na českém území byla odrůda Amarin. Další šlechtění máku pokračovalo na Slovensku ve Šlechtitelské stanici v Malém Šariši.

V roce 1959 byla registrována odrůda Hybrid HD. Tato odrůda vznikla kastrací tyčinek mateřské rostliny (Hanácký modrý) a přenosem pylu z otcovské rostliny (Dětenický bělosemenný). Výnos hybridní odrůdy byl až o 20% vyšší než u klasických odrůd, avšak v praxi své uplatnění nenašla z důvodu vysokých ekonomických nákladů na osivo.

Ke znovuobnovení šlechtění máku setého na českém území došlo v 90. letech na pracovišti OSEVA PRO v Keřkově a na Výzkumném ústavu olejnin v Opavě (Vašák a kol., 2010).

2.5.2 Šlechtitelské cíle

V České republice

V minulosti bylo hlavním šlechtitelským cílem vyšlechtit odrůdu univerzálního typu s vysokým výnosem semen a zároveň vysokým obsahem morfinu v tobolkách. Šlechtění takové odrůdy je však problematické kvůli negativní korelaci mezi těmito znaky, a proto se postupně diferencovaly specifické směry šlechtění (Bechyně, 2001).

Výnos semene závisí na odrůdě, podmínkách klimatu, kvalitě půdy a agrotechnice. Průměrný výnos z 1 hektaru se v praxi pohybuje od 0,4 t do 1 t. Pro šlechtění se hodnoty odvíjejí od hodnot získaných v maloparcelních podmínkách. Ty jsou u máku výrazně vyšší, a průměrný výnos se pohyboval kolem 2,1 t.

Výnos tobolek je dalším sledovaným znakem hlavně u průmyslově využívaných odrůd. Úroda tobolek spolu s obsahem alkaloidů podmiňuje výnos alkaloidů na hektar. U potravinářského máku se sleduje tvar tobolky, kvůli výnosu semen. Nejvyšší výnos poskytují oválné, středně velké tobolky.

Ve šlechtění se sleduje i **celková stavba rostliny**. Všeobecně se uvádí, že jsou lepší nízké až středně vysoké rostliny, s mohutným kořenovým systémem, pevným a pružným stonkem. Výše zmíněné vlastnosti podmiňují sledovaný znak, kterým je poléhavost rostlin. Dalším sledovaným znakem je větvení rostlin, které je u máku nežádoucí. Požadavky na tyto znaky jsou však diskutabilní. Je známá pozitivní korelace mezi výškou rostliny a úrodou semene. Z toho vyplívá, že střední a vyšší genotypy dosahují vyššího výnosu semen, naopak nižší genotypy mají nižší výnos semen s vyšším obsahem alkaloidů (Bechyně, 2001).

Dalším cílem šlechtění je **odolnost vůči chorobám.** Jedná se o rezistenci k plísni makové (*Peronospora arborescens*) způsobující vlivem primární infekce deformaci listů, zakrnění a pozdějšímu odumírání rostlin. Při sekundární infekci dochází k tvorbě žlutozelené skvrny na listech. Často dochází k deformacím a odumírání vegetačního vrcholu, při pozdním napadení i praskání makovic. V Indii se podařilo vyšlechtit odrůdy odolné proti této chorobě (Rakshit, Madakini) (Vašák a kol., 2010). Nadále je snaha šlechtit odrůdy odolné proti helmintosporióze (*Helminthosporium papaverin).* Tento patogen napadá rostliny již během vzcházení a způsobuje hnilobu kořenového krčku a padání rostlin. Později způsobuje nepravidelné hnědé skvrny na listech, listová plocha postupně odumírá. Při napadení stonků se na nich tvoří modročerné podélné kroužky.

Další sledovanou vlastností je odolnost proti **abiotickým faktorům**, hlavně suchu. Šlechtěním ozimých odrůd se směřuje k dobré odolnosti proti mrazu.

Další nežádoucí vlastností u máku setého je **tvorba tzv. „hleďáků".** Toto označení se používá u tobolek, u kterých se vyskytuje štěrbina pod korunkou a dochází k vysypání semen. V ČR jsou registrované odrůd typu „slepák" (uzavřené pod korunkou), „hleďáky" se vyskytují pouze zřídka.

Ve velkovýrobě je důležitá **odolnost proti herbicidům**. Rezistence můžeme dosáhnout použitím herbicidů již od počátku prvních generací šlechtění a výběrem odolných linií (Bechyně, 2001; Vašák a kol., 2010; Zehnálek, 2018)

Šlechtitelská stanice zabývající se šlechtěním máku setého na území České republiky je VÚO v Opavě. V této stanici byla vyvinuta komplexní pěstitelská technologie pěstování máku a zaváděna do praxe, což přispělo k úspěchům

v pěstování máku na přelomu 80. a 90. let. Novošlechtění máku z této šlechtitelské stanice jsou zkoušeny ve státních odrůdových zkouškách (VÚO Opava, 2003).

Ve světě

Ve světě se šlechtění máku setého rozděluje do třech šlechtitelských směrů. Prvním směrem je šlechtění odrůd s vysokým množstvím morfinu nebo jiných alkaloidů (např. kodein, thebain, papaverin, narkotin). Druhým směrem šlechtění jsou odrůdy pro produkci oleje a osiva neobsahující žádné nebo pouze malé množství alkaloidů. Třetím, méně významným směrem ze zemědělského hlediska, je šlechtění dekorativních odrůd máku se zvláštní barvou květu a tvarem makovice (Fejér, 2014). Tyto odrůdy jsou též šlechtěny na VÚO Opava.

Vzhledem k neustále rostoucí globální poptávce po různých druzích alkaloidů, se ve světě (převážně v Indii a Turecku) zabývají šlechtěním na obsah právě těchto narkotických látek využívaných především v medicíně. Nadále probíhá šlechtění na bezalkaloidové odrůdy máku, kvůli možnosti pěstování bez zvláštního povolení nebo licence (Kishore et. al., 2013).

Nadále je uváděno šlechtění na různé morfologické znaky. Mezi tyto znaky řadíme např.: výnos tobolek na rostlinu, celkovou výšku rostliny (důležitá pro mechanismus sklízení), dobře vyvinutý kořenový systém (stabilita rostliny, suchovzdornost) (Fejér, 2014).

Ve světě, stejně jako v ČR probíhá šlechtění na rezistence proti různým druhům herbicidů, škůdců a onemocněním způsobených bakteriálními nebo houbovými původci.

2.6 Odrůdy máku setého

Odrůdy máku setého jsou v ČR liniového původu. Hybridní odrůdy nejsou v současné době registrovány a ani se nešlechtí.

Rozdělení odrůd dle požadavků a využití:

- **Průmyslové odrůdy:** jsou odrůdy se silně vyvinutými mléčnicemi obsahující různé druhy a množství alkaloidů v latexu. Průmyslové odrůdy jsou nadále děleny na **morfinové odrůdy** a **odrůdy s jiným alkaloidovým složením**. Mezi morfinové odrůdy řadíme rostliny s obsahem morfinu v tobolkách 1%

a více. U odrůd s jiným alkaloidovým složením nás zajímá obsah např. kodeinu, narkotinu a thebainu.

- **Potravinářské odrůdy:** jsou odrůdy, jejichž hlavním cílem je vysoká produkce kvalitního semene pro potravinářské účely. Mezi požadované vlastnosti semene jsou řazeny dobrá chuť, složení oleje a mastných kyselin, barva a vyrovnanost semene.
- **Okrasné odrůdy:** odrůdy, do nichž jsou řazeny máky se speciální barvou a tvarem květů anebo se speciálním tvarem tobolky (Vašák a kol., 2010)

Z pěstitelského hlediska členíme odrůdy máku do těchto skupin:

- **Modrosemenné s nízkým a nízkým až středně vysokým obsahem morfinu** (v současné době není v EU registrována žádná odrůda tohoto typu)
- **Modrosemenné se středně vysokým obsahem morfinu**
  semeno využito jako potravina, makovina jako surovina pro farmaceutický průmysl např. odrůdy Aplaus, Bergam, Maratón
- **Modrosemenné se středně vysokým až vysokým obsahem morfinu**
  makovina a využita jako surovina pro farmaceutický průmysl, semeno pro potravinářské využití např. odrůdy Onyx, Opex, MS Harlekyn
- **Modrosemenné s velmi nízkým obsahem morfinu**
  v současné době není v EU registrována žádná odrůda tohoto typu
- **Bělosemenné, okrovosemenné s nízkým a nízkým až středně vysokým obsahem morfinu**
  semeno jako potravina s oříškovou příchutí např. Akvarel, Redy (Zehnálek, 2018)

Členění odrůd dle barvy květu:

- **bělokvěté** (Major)
- **růžovokvěté** (Albín)
- **červenokvěté** (Mieszko)
- **fialovokvěté (**Zeno Plus) (Bechyně, 2001)

Obr. č. 1 Různé zbarvení a tvar květu u máku setého (https://wimastergardener.org)

Členění dle barvy semen:

- **modrosemenné:** typická barva, využívaná v mnoha odstínech. Například odrůdy Onyx, Opex, Orbis)
- **bělosemenné:** toto zbarvení, není u máku neobvyklé. Díky propagaci si i tato barva získává své místo na trhu. Mák s touto barvou semene má svoji typickou příchuť lískových oříšku. Například odrůdy Orel, Racek, Akvarel (Baranyk a kol., 2010)
- **okrosemenné:** u nás je registrována např. odrůda Rudy.
- **ostatní zbarvení:** šedosemenné, fialovosemenné, žlutosemenné, černosemenné, růžovosemenné, hnědosemenné **(**Bechyně, 2001; Kameníková, 2005)

Obr. č. 2 Různé zbarvení semen máku setého (http://gengel.cz/3327-mak-sety)

Členění dle genetického základu ozimosti:

- **jarní:** zaujímají přibližně 95% z celkové osevní plochy máku v České republice
- **ozimé:** V ČR není v současné době registrována žádná odrůda tohoto typu. Na základě společného katalogu odrůd EU mohou být pěstovány dvě odrůdy, a to Zeno 2002 a v roce 2017 registrovaná odrůda Oz (Dobos, 2005). Ozimé odrůdy mají přednost především ve vzcházení, mají vyšší výnos semene, nižší obsah morfinu, vyšší obsah oleje a ranější sklizeň (Baranyk a kol., 2010)

2.7 Biodiverzita

Biodiverzita je definována jako rozmanitost všech žijících organismů. Zahrnuje diverzitu v rámci druhů, mezi druhy i diverzitu ekosystémů. Za základní dokument, který se týká biologické rozmanitosti je „Úmluva o biologické rozmanitosti“ podepsané na Summitu Země v Riu de Janeiru v roce 1992. Dle této úmluvy dělíme diverzitu na genomovou (genetická variabilita v rámci druhu), druhovou (druhová rozmanitost) a ekosystémovou - rozmanitost na úrovni společenstev a ekosystémů (Chloupek, 2008).

Proces zachování genetické diverzity uchováváním živého rostlinného materiálu v genových bankách se u rostlin využívá téměř sto let. Dnes se na Zemi vyskytuje 300 000 až 500 000 druhů vyšších rostlin, z nich bylo kolem 250 000 popsáno. Asi 80 000 druhů je jedlých a kolem 7 000 se využívá pro zemědělství a jako zdroj potravy. Pouze 30 druhů plodin se řadí mezi tzv. „rostliny co krmí svět“, protože poskytují 95% energie (kalorií) nebo bílkovin ve stravě světové populace (Milosevic, 2010).

Genetická diverizita je důležitá pro reprodukční vitalitu druhu, jeho odolnost vůči stresu a schopnost adaptace na různé podmínky prostředí. Genetická diverzita u rostlin je velmi důležitá ve šlechtitelských programech, kde je nezbytná pro udržení a zlepšení vlastností druhů využívaných v zemědělství. Obecně se jedná o genetickou variabilitu v rámci druhu, a to mezi geograficky oddělenými populacemi, i mezi jedinci populace jedné (Calişkan, 2012). V roce 2004 byla na konferenci FAO (Food and Agriculture Organization) uzavřena mezinárodní smlouva o rostlinných genetických zdrojích pro výživu a zemědělství. Tato smlouva sdružuje rostlinné genetické zdroje a umožňuje jejich sdílení a použití. V dnešní době je tlak na šlechtění zemědělských plodin vysoký, kvůli měnícím se environmentálním podmínkám a zvyšování počtu obyvatel. Důležitá pro dnešní šlechtění je genetická rozmanitost vyskytující se u tradičních a kulturních odrůd, poskytují nám geny např. pro rezistenci a odolnost (FAO, 2018).

Ve státech zabývajících se šlechtěním máku setého se využívá analýz genetické diverzity pomocí molekulárních markerů. Častěji se jedná o státy, kde je mák šlechtěn převážně na množství a obsah různých druhů alkaloidů. Znalost genetické rozmanitosti ekonomických vlastnost je potřebná právě pro navržení efektivního plánu šlechtění, které vede k dosažení šlechtitelských cílů

(Lahiry et. al., 2018). Dříve využívané metody se opíraly především o morfologické, agrotechnické a biochemické znaky a vlastnosti. Díky znalosti genetické diverzity můžeme předcházet zužování genetické základny máku setého. Bylo prokázáno, že různé markery mohou odhalit různé stupně variability, například Khatik et. al. (2017) ve svém článku uvádí, že při analýze RAPD došlo k rozdělení vzorků máku na jednu hlavní skupinu a čtyři vedlejší. Zatímco Archarya (2009) ve svém článku uvádí při použití kombinace metody RAPD a ISSR rozdělení do hlavní skupiny A a vedlejších skupin B, C, D. Tyto výsledky poukazují na nízkou genetickou rozmanitost pěstovaných odrůd máku.

2. 8 Molekulární markery

Analýza biologické diverzity mezi různými populacemi, druhy i jedinci je předmětem mnoha biologických vědních disciplín. Při hodnocení genetické variability byly dříve využívány morfologické a fyziologické vlastnosti. Dnes jsou tyto vlastnosti stále častěji doplňovány moderními analytickými a molekulárními technikami. Mezi tyto metody řadíme například metabolomiku, transtriptomiku, a současně jsou vyvíjeny molekulární markery pro šlechtění (Weising, 2005). Srovnání jednotlivých skupin markerů je v tabulce č. 1.

Markery dělíme do těchto skupin:

- **Morfologické markery**: nazývané taktéž klasické nebo viditelné markery. Řadíme mezi ně například stavbu rostliny, tvar semen, barvu květu, pigmentaci.
- **Biochemické markery (izoenzymy):** alelické varianty enzymů, které jsou detekovány pomocí 2D elektroforézy. Mají schopnost rozmanitosti funkčních genů.
- **Molekulární markery (DNA markery):** založené na odlišnostech v sekvencích např. RFLP, RAPD, SSR atd. (Hayward at al., 2015)

Šlechtění rostlin hraje klíčovou roli při zvyšování výnosu plodin. Díky měnícím se klimatickým podmínkám jsou pěstitelé vystavováni různým faktorům, které snižují výnos u různých druhů plodin. Pokrok dosažení ve vývoji molekulárních markerů připravuje cestu pro dosažení stanovených cílů šlechtění a

rozvoji lepších odrůd přizpůsobených k různým agro-klimatickým podmínkám (Al-Samarai, 2015).

Tabulka č. 1 Srovnání jednotlivých druhů markerů
(Havlíčková et al., 2014; Muhammad et. al., 2018)

Marker		Výhody	Nevýhody
Morfologické markery		Snadné použití Levné Využití Fenotypu	Málo polymorfní Ovlivněno prostředím Ovlivněno růstovým stupněm rostliny
Biochemické markery		Nepotřebuje speciální vybavení Snadné použití Kodominantní	Méně polymorfní Ovlivněno prostředím
Molekulární markery	RFLP	Kodominantní Nepotřebuje znalost sekvence	Časově náročné Vysoká náročnost na čistotu a množství DNA Drahý
	RAPD	Snadné použití Menší množství DNA Polymorfní	Dominantní, Nutná vysoce purifikovaná DNA Nízká reprodukovatelnost Málo specifický
	AFLP	Spolehlivý Vysoká reprodukovatelnost Mnoho informací	Dominantní Nutná vysoce purifikovaná DNA Velké množství DNA
	SSR	Kodominantní Vysoká reprodukovatelnost	Vysoké náklady při optimalizaci Přítomnost více nulových alel Nutnost znalosti genomu
	ISSR	Vysoce polymorfní Nepotřebujeme znát sekvenci	Nízká reprodukovatelnost Čistá DNA Fragmenty nemají stejnou velkost
	SNP	Široká distribuce v genomu Vysoká reprodukovatelnost Velmi dobrý poměr cena/výkon	Dominatní Vysoké vývojové náklady
	DArT	Velmi dobrý poměr cena/výkon Vysoká propustnost Vysoce polymorfní Nepotřebujme znát sekvenci Vysoká reprodukovatelnost	Dominantní značka Vysoké vývojové náklady

DNA markery dělíme do dvou hlavních kategorií. První kategorií jsou markery založené na principu hybridizace. Řadíme sem metody RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), DNA microarray, DArTt (Diversity array technology). Hybridizační metody jsou založeny na principu nasednutí denaturované DNA na fluorescenčně značenou sondu o známé sekvenci (Pokhriyal et. al. 2012).

Druhou kategorii tvoří markery založené na PCR amplifikaci. Řadíme sem metody RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR Inter Simple Sequence Repeats), SNP (Single Nukleotid Polymorfism) a SSR (Simple Sequence Repeat). Tyto metody jsou založeny na PCR in vitro amplifikaci specifických sekvencí DNA nebo lokusů, pomocí zvolených primerů (uměle nasyntetizované oligonukleotidové sekvence). Detekce velikosti amplifikovaných fragmentů z těchto analýz probíhá na elektroforéze nebo fragmentační analýzou (Muhammad et. al., 2018). Porovnání DNA markerů je v tabulce č. 2.

Pro molekulární markery jsou obecně žádoucí tyto vlastnosti:

- Střední až vysoký projev polymorfismu
- Kodominantní dědičnost
- Jednoznačné určování alel
- Častý výskyt v genomu
- Rovnoměrné rozložení v genomu
- Snadný přístup (tzn. cenová dostupnost, rychlý pracovní postup)
- Vysoká reprodukovatelnost
- Snadná výměna dat mezi laboratořemi
- Nízké náklady na vývoj a analýzu markeru (Kumar et. al., 2009)

Tabulka č. 2 Porovnání druhů molekulárních markerů
(Muhammad et. al. 2018)

Vlastnosti	RFLP	RAPD	AFLP	ISSR	SSR	SNP	DArT
Dědičnost	Kodominantní	Dominantní	Dominantí	Dominantní	Kodominantní	Kodominantní	Dominantní
Reprodukovatelnost	Vysoká	Vysoká	Střední	Středně vysoká	Vysoká	Vysoká	Vysoká
Požadavek na kvalitu DNA	Vysoký	Vysoký	Vysoký	Nízký	Nízký	Vysoký	Vysoký
Požadavek na kvantitu DNA	Vysoký	Střední	Nízný	Nízký	Nízký	Nízký	Nízký
Hojnost v genomu	Vysoká	Velmi vysoká	Velmi vysoká	Střední	Střední	Velmi vysoká	Velmi vysoká
Náklady	Vysoké	Nízké	Vysoké	Vysoké	Vysoké	Variabilní	Nízké
Znalost sekvence	Ano	Ne	Ne	Ne	Ano	Ano	Ano
Vizualizace	Radioaktivně	Elektroforéza	Elektroforéza	Elektroforéza	Elektorforéza	SNP-VISTA	Microarray
Množství DNA (ng)	10 000	20	500 - 1000	50	50	50	50 - 100

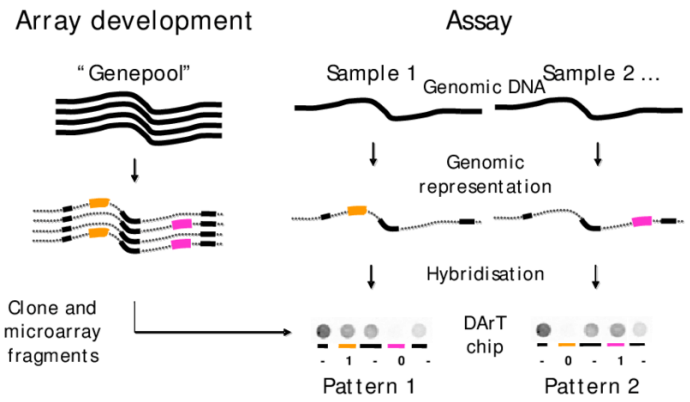
2.8.1 DNA markery založené na principu hybridizace

RFLP (Random Amplification of Polymorfic DNA)

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Random Amplification of Polymorfic DNA) je dnes již nevyužívanou metodou, ale byla to jedna z prvních analýz DNA používaná ve forenzní vědě a dalších vědních oborech (Al-Samarai et. al., 2015). Principem metody je enzymatické rozštěpení DNA ve specifickém místě pomocí restrikčních enzymů. Endonukleázy štěpí cílovou DNA v závislosti na sekvenci. Po rozštěpení vznikají různě dlouhé fragmenty, které jsou separovány pomocí elektroforézy na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Dle velikosti a počtu fragmentů se sledují rozdíly ve studovaných sekvencí tzv. polymorfizmy. Polymorfizmy restrikčních míst vznikají různými přetavbami např. delecemi, inzercemi, substitucemi (Williams et. al., 1989).

DArT (Diversity array technology)

Tato metoda byla poprvé použita v roce 2000. Poskytuje příležitost pro genotypizaci polymorfních lokusů distribuovaných v celém genomu. Obecně se uvádí, že DArT metoda je vysoko kapacitní, nízkonákladová, rychlá a vysoce reprodukovatelná microarray hybridizační technologie. Není nutná předešlá znalost sekvence žádaného znaku (Muhamnad et. al., 2018). Analýza probíhá na základě hybridizace na mikročipu (tzv. DArT array). Na čipu jsou upevněny sondy (fragmenty DNA s nezametylovanou oblastí genomu) tzv. genomové reprezentace. Ty jsou připravovány ze souboru jedinců téhož rodu/druhu (Wenzl et. al., 2015). Princip metody je zobrazen na obrázku č. 3.



Obr. č. 3 Princip vývoje DArT analýzy (Wenzl et. al. 2015)

2.8.2 Markery založené na principu PCR

RAPD (Radom amplification of polymorfic DNA)

Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů DNA je metoda poprvé popsaná v roce 1990. Při této metodě se používá pouze jeden krátký (10 bází) oligonukleotidový primer, který se váže k jakémukoli komplementárnímu místu v genomu. Namnoží se pouze úseky DNA, u nichž se nachází vazebná místa v amplifikovatelné vzdálenosti. Separace jednotlivých fragmentů probíhá na gelové elektroforéze (Koh et. al., 2015).

Výhoda této metody, je v její jednoduchosti, rychlosti a nenáročnosti. Nevýhodou této metody je problém s opakovatelností a reprodukovatelností ovlivňovanou mnoha faktory např. kvalitou a množstvím DNA, typem DNA polymerázy, koncentrací hořčíku (Weising, 2005).

Analýza RAPD je používána ke studiu genetické variability, genetické struktury populací, hybridní čistoty druhů, mapování genomu, populační a evoluční genetiky a v různých forenzních studiích (Kumar et. al., 2011). U máku setého byla tato analýza využita v roce 2009 a 2017 v Indii u různých skupin máku setého. Analýza byla provedena u kříženců, rodičů a kontrol (Shanker, 2009; Khatik et. al., 2017).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Metoda polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů byla poprvé popsána v roce 1995 (Vos et. al., 1995). AFLP představuje kombinaci mezi RFLP a PCR analýzou, která se stala jedním z nejpopulárnějších přístupů k detekci polymorfimu (Weising, 2005).

AFLP se dělí do několika fází. V první fází dochází k restrikci dvěma restrikčními enzymy, každý z nich štěpí s jinou frekvencí. První endonukleáza štěpí častěji (rozpoznávání 3 bází, např. enzym *Eco*RI), druhá štěpí vzácněji (rozpoznávání 6 bází, např. enzym *MseI*). Ve druhé fázi jsou na vzniklé fragmenty pomocí ligáz připojeny adaptéry o známé sekvenci. Ve třetí fázi dochází k amplifikaci DNA pomocí primerů komplementárních k sekvenci adaptérů s připojením 1-6 známých bází (Muhamnad et. al., 2018). Výsledné produkty jsou vizualizovaný pomocí různých metod např. gelovou elektorforézou (Vos et. al., 1995), polyakrylamidovou elektroforézou (Saunders, 2001) nebo fragmentační analýzou, kdy je jeden z primerů značen fluorescenční barvou. Dle zvolené metody vizualizace mohou být detekovány různé počty fragmentů. Při použití gelové elektroforézy detekujeme do padesáti fragmentů, kdyžto při použití fragmentační analýzy detekujeme až stovky fragmentů (Muhamnad et. al., 2018).

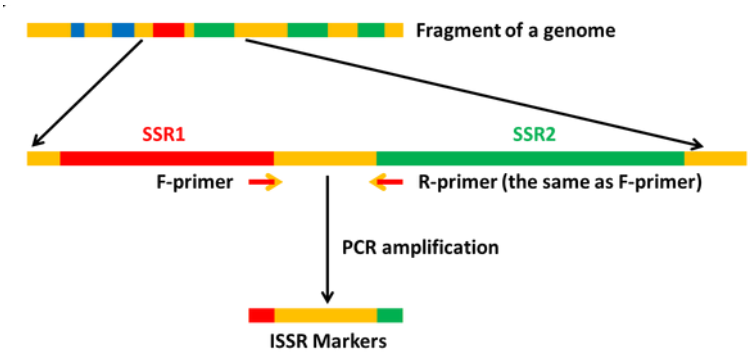
AFLP se využívá k posuzování genetické rozmanitosti v rámci jednoho druhu nebo rodu, k odvození fylogenetických a biogeografických modelů na úrovni populací, generování genetických map a určení závislosti mezi jednotlivými druhy. Rovněž byly vyvinuty modifikace standardní AFLP pro použití v transkriptomice (Paun et. al., 2012). Analýzu AFLP u máku setého použil Saunders v roce 2001 u opiových odrůd máku setého pocházejících z Austrálie a Tasmánie. V roce 2016 Celik popsal AFLP lokusy asociované s hospodářsky významnými vlastnostmi.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Metoda ISSR byla poprvé popsána v roce 1994. Tato metoda je založena na amplifikaci fragmentů DNA mezi identicky orientovanými oblastmi mikrosatelitových repetic. Velikosti segmentů se pohybuje v rozmezí 100-3000 párů bází. Tato metoda využívá pouze jeden primer, který plní funkci forward i reverse primeru. Na obr. č. 4 je zobrazen princip ISSR (Muhamnad et. al., 2018).

ISSR využívá mikrosatelitové sekvence jako primery. Primery s opakováním (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) a (CA) vykazují vyšší úroveň polymorfismu než primer s opakováním (AT). Primer s touto sekvencí tvoří často tzv. vlásenky (Pradeep et. al., 2002).

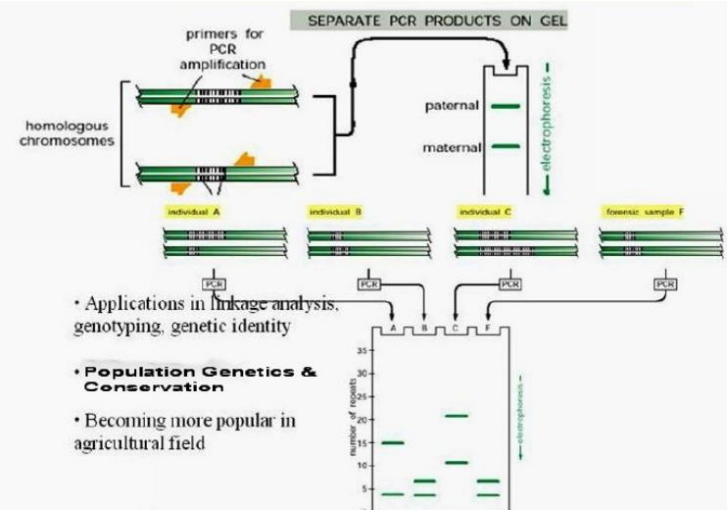
Pro separaci vzniklých fragmentů se využívá gelová elektroforéza, elektroforéza na polyarylamidovém gelu nebo čipová elektroforéza. ISSR se používá při studiu genetické diverzity, určování paternity, studiích taxonomicky blízce příbuzných druhů (Weising 2005). Tato metoda byla použita při analýze tureckého máku spolu s metodou SSR (Güçlü, 2014).



Obr. č. 4 Princip metody ISSR (Sudarsono, 2013)

SSR (Simple semence repeal)

Metoda SSR využívá primery (délka 20-25 bází) se specifickou sekvencí, které bezprostředně přiléhají k mikrosatelitové sekvenci. Mohou být použity primery navržené pro příbuzné jedince nebo druhy. Na obr. č. 5 je zobrazen princip metody SSR. Vizualizace této metody probíhá pomocí gelové a čipové elektroforézy nebo pomocí fragmentační analýzy (Muhamnad et. al., 2018). Şelale (2013) použil SSR analýzu u různých odrůd máku setého společně s dalšími druhy čeledi *Papaveraceae*. Tato analýza je často používána v kombinaci s jinými molekulárními markery, například ISSR (Gülşen et. al., 2014) a AFLP (Celik, 2016).



Obr. č. 5 Princip metody SSR (Seielsta et. al., 2001)

Mikrosatelity známé také jako jednoduché se opakující sekvence (SSR – simple sequence repeats), krátké tandemové repetice (STR – short tandem repeats), tandemové repetice o variabilním počtu (VNTR – variable number tandem repeat) nebo krátká sekvence polymorfismu (SSLPs – simple sequence length polymorphisms) jsou tandemově opakující se sekvence o délce 1-10 bazí (nejčastěji 2-6 bází). Tento motiv se opakuje 5x až 50x. Nacházející se ve velkém množství v celém prokaryontním i eukaryotním genomu a to v kódujících i nekódujících oblastech (Al-Samarai, 2015; Vieira, 2016).

Dlouhou dobu byly mikrosatelitové sekvence považovány za „nevyžádanou“ DNA a používaly se jako „neutrální“ genetické markery. V posledních letech bylo prokázáno, že mikrosatelity mají mnoho důležitých biologických funkcí

např. regulace uspořádání chromatinu, účast na metabolických procesech DNA, vliv na genové exprese a strukturu RNA (Vieira, 2016).

Mikrosatelity jsou díky vysoké mutační rychlosti velmi polymorfní, to znamená, že se nacházejí v různých variantách v rámci jedné populace (Weising, 2005). Příklad dvou odlišných alel:

Alela A: TATATA (3 opakování TA sekvence)

Alela B: TATATATATA (5 opakování TA sekvence)

Dle délky repetice dělíme mikrosatelity na mononukleotidové (např. TTTT), dinukleotidové (např. TATA), trinukletidové (např. TACTAC) a tetranukleotidové (např. TACATACA) atd. (Tóth et al., 2000). Nejčastěji vyskytující se mikrosatelitové repetice u máku setého jsou trinukleotidové, u kterých se uvádí frekvence 49%. Nejrozšířenější trinukleotidovou repeticí je AAG/TTC (19,7%). Následují tetranukleotidové repetice zastoupeny 27,9% z celkového počtu mikrosatelitů (Çelik, 2014). Nadále můžeme rozdělit mikrosatelity dle struktury sekvence. Dokonalé mikrosatelity, nejsou přerušeny žádnou bází (např. …$(AC)_{25…}$). Nedokonalé mikrosatelity obsahují bázi, která do motivu nepatří (např. …$(AC)_{25}T(AC)_{15}$…). Přerušené mikrosatelity obsahující krátkou sekvenci, která do motivu nepatří (např. ...$(AC)_{25}TAT(AC)_{15…}$). Složené mikrosatelity obsahují zpravidla dvě opakující se sekvence (např. …ACACACTGTGTG…) (Bhargava et. al., 2010).

Frekvence mutace mikrosatelitů je uváděna v rozmezí 10^{-3} do 10^{-4} lokus na generaci, což je mnohem vyšší rychlost mutací, než je běžná u DNA polymerázy. Rychlost mutací u mikrosatelitů je vysvětlována dvěma mechanismy, nerovnoměrnou rekombinací a sklouznutím DNA polymerázy (Seyfert et. al., 2008). Na rychlost mutací působí mnoho faktorů. Mezi nejdůležitější faktory řadíme délku mikrosatelitu, počet repetic, nukleotidové složení mikrosatelitu, délku motivu a sekvenci obklopující lokus, přerušení repetivní sekvence, způsob reprodukce organismu, rychlost metabolizmu, generační interval, věk a pohlaví (Buschiazzo et. al., 2006).

2.8.3 Vyhodnocování molekulárních markerů

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza pomocí agarosového nebo polyakrylamidového gelu je standartní metodou využívanou k separaci, identifikaci a purifikaci DNA, RNA nebo proteinů (Magdeldin, 2012). Koncentrace, složení a poréznost gelu je volena s ohledem na specifickou hmotnost a typ analyzovaného vzorku (Robyt a White, 1990). Výhody a nevýhody agarosového a polyakrylamidového gelu jsou popsány v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Výhody a nevýhody jednotlivých druhů gelů (Magdeldin, 2012)

	Výhody	Nevýhody
Agarosový gel	Dobrý pro oddělení velkých molekul Netoxické gelové médium Snadná a rychlá příprava Možnost izolace vzorku z gelu	Vysoké náklady na agarosu Špatná separace molekul s nízkou hmotností Rozmazané bandy (u některých typů metod)
Polyakrylamidový gel	Chemicky stabilní gel Ostré bandy Dobrý pro oddělení molekul s nízkou hmotností	Toxický monomer Složitá příprava

Pro vizualizaci DNA se používají různé druhy interkalačních činidel, které je možno nanést přímo do vzorku, do elektroforetického pufru nebo přimíchat do gelu. Nejčastěji používaným činidlem v agarosových gelech je ethidium bromid. EtBr se váže na dsDNA a při prosvícení UV světlem se uvolňují elektrony, což vede k uvolnění energie, světla (Ovesná et. al., 2010). Kvůli pozitivnímu náboji snižuje EtBr rychlost migrace až o 15%. Ethidium bromid je považován za mutagen a karcinogen. Alternativní barviva využívaná pro vizualizaci DNA jsou např. SYBR Green, SYBER Gold, Crystal Violet a methylová modř (Lee et. al., 2012).

Čipová elektroforéza

Čipová elektroforéza byla objevena jako důležitá analytická metoda na počátku 90. let skupinou vědců z Ciba Geigy. K separaci dochází v kanálcích vyleptaných na čipu za použití mikrofabrikačních metod (Henry, 2006). Původně byly mikročipy vyráběny ze skla nebo křemene. Výroba z těchto materiálů byla

nákladná, složitá, a proto se pro výrobu mikročipů začaly využívat různé druhy polymerů např. polydimethylsiloxan a polymethylmethakrylát (Chen et al., 2006).

Čipová elektroforéza umožňuje analýzu až desítek vzorků současně. Čipová elektroforéza může probíhat dvěma způsoby. Buď pomocí vysokého napětí, při kterém dochází k automatickému nanášení ramenem na čip, nebo prostřednictvím elektrod se základním elektrolytem, kdy jsou vzorky nanášeny přímo na čip a následně vpraveny elektrokineticky do kanálků. Tento způsob je velmi náročný na pipetování, nesmějí se vyskytovat bubliny (Wu et al., 2008).

Tato metoda získala v posledních letech hodně pozornosti díky široké využitelnosti. Využití nalezla v monitorování životního prostředí, v klinické diagnostice, forenzní genetice, biomedicíně i ve farmacii (Henry, 2006).

Fragmentační analýza

Fragmentační analýza probíhá v genetickém analyzátoru a principielně se jedná o kapilární elektroforézu DNA fragmentů značených tzv. fluofory. Do PCR reakce se přidá jeden fluorescenčně značený primer z každého páru primerů. Při průchodu kapilárou jsou fragmenty rozděleny dle délky a po ozáření laserem dojde k vyzáření signálu, který je zaznamenán detektorem. Při této analýze můžeme použít až čtyři různé fluorescenční barvy a tím značně snížit náklady na analýzu (Jozová, 2014). Velikost jednotlivých fragmentů je porovnávána s velikostním standartem (Dakin et. al., 2004)

Fragmentační analýza našla své využití u mnoha molekulárních markerů, jako např. SSR, AFLP atd. Taktéž našla uplatnění v mnoha vědních oborech jako je klinická diagnostika forenzní genetika, biomedicína.

3. Hypotézy a cíle práce

Hypotézy diplomové práce:

- Je možné pomocí molekulárních markerů detekovat odlišnosti mezi studovanými genotypy?
- Jsou molekulární markery vhodným nástrojem pro studium genetické diverzity máku?

Tato práce má tyto hlavní cíle

- Optimalizace primerů
    - Testování nejvhodnějších SSR primerů pro posouzení variability máku setého
    - Optimalizace PCR pro jednotlivé primery
- Porovnání využití gelové, čipové elektroforézy, fragmentační analýzy
- Hodnocení genetické diverzity vybraných odrůd a novošlechtění máku setého
    - Výpočet matice příbuznosti pomocí programu MVSP

4. Materiál a metodika

Jako materiál pro analýzu genetické diverzity byly vybrány české i zahraniční odrůdy a šlechtitelský materiál. Celkem bylo od společnosti Oseva PRO – odštěpný závod VÚO Opava přijato osivo 49 odrůd původních i z novošlechtění a 36 vzorků šlechtitelského materiálu. Popis přijatých vzorků je znázorněn v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 Seznam vzorků vybraných pro analýzu genetické diverzity

Číslo	Název	Země původu	Dat. registrace	Typ materiálu
1	Agat	POL	2000	odrůda
2	Akvarel	CZE	2015	odrůda
3	Bílý vanilkový	CZE	neregistrován	krajový
4	Botond	HUN	2006	odrůda
5	Hen and chickens	zahr. odrůda, distribuce	neznámý	okrasný mák
6	Modrý Valašsko	CZE	neregistrován	krajový
7	Morfeusz	POL	2012	odrůda
8	Orbis	CZE	2012	odrůda
9	Rubin	POL	1999	odrůda
10	Soma	neznámý	neznámý	odrůda
11	Strakonický červený	CZE	neregistrován	krajový
12	Tebona	HUN	2000	odrůda
13	Úvalno 483/1	CZE	neregistrován	krajový
14	Zehnálkův strakatý	CZE	neregistrován	výběr z Opalu
15	Červený Šitbořice	CZE	neregistrován	krajový
16	Viktor 502	CZE	neregistrován	odrůda
17	Skorý sivý	SVK	neregistrován	krajový
18	Strube	neznámý	neznámý	odrůda
19	P 360	BUL	1973 do kolekce	odrůda
20	Cluj A	ROM	1974 do kolekce	odrůda
21	Yonne	neznámý	neznámý	odrůda
22	Boehmuv belosemenny	neznámý	neznámý	odrůda
23	Pao.somn.var albiflora	neznámý	neznámý	odrůda
24	Prejmer bily	neznámý	neznámý	odrůda
25	Gerlach	CSK	1990	odrůda
26	Pap.somn. Z Laosu	Laos	neregistrován	v našich podmínkách nízkomorfinový, ale předpokládá se, že geneticky vysocemorfinový
27	Lazur	POL	2000	odrůda
28	Lazur IHAR	POL	2000	odrůda
29	Extaz	ROM	1990 do kolekce	odrůda

30	Opal	SVK	1995 do kolekce	odrůda
31	Florian	AUT	2003	odrůda
32	Sarrisky	SVK	2002 do kolekce	odrůda
33	Solivarsky	SVK	2002 do kolekce	odrůda
34	Ruzbarsky	SVK	2002 do kolekce	odrůda
35	Maraton	SVK	2000	odrůda
36	Major	SVK	2002	odrůda
37	Malsar	SVK	2006 do kolekce	odrůda
38	Bergam	SVK	2014	odrůda
39	Buddha	HUN	2004	odrůda
40	Orel	CZE	2008	odrůda
41	Racek	CZE	2008	odrůda
42	Redy	CZE	2008	odrůda
43	Orfeus	CZE	2012	odrůda
44	HUNBAL-09/6	HUN	neregistrován	sběrová expedice
45	HUNPAN-09/36	HUN	neregistrován	sběrová expedice
46	HUNZAL-10/59	HUN	neregistrován	sběrová expedice
47	Postomi	HUN	2004	odrůda
48	Ruski obri	CZE	neregistrován	krajový
49	Ametiszt	HUN	2003	odrůda
50	2283			Šl. Materiál
51	2284			Šl. Materiál
55	2288			Šl. Materiál
57	2290			Šl. Materiál
58	2291			Šl. Materiál
59	2292			Šl. Materiál
60	2293			Šl. Materiál
63	2296			Šl. Materiál
66	2299			Šl. Materiál
67	2300			Šl. Materiál
68	2301			Šl. Materiál
69	2302			Šl. Materiál
70	2303			Šl. Materiál
71	2304			Šl. Materiál
72	2305			Šl. Materiál
74	2307			Šl. Materiál
76	2309			Šl. Materiál
77	2310			Šl. Materiál
78	2311			Šl. Materiál
79	2312			Šl. Materiál
80	2313			Šl. Materiál
81	2314			Šl. Materiál
82	2315			Šl. Materiál
83	2316			Šl. Materiál
85	1672			Šl. Materiál

87	1675			Šl. Materiál
88	1677			Šl. Materiál
92	1681			Šl. Materiál
93	1682			Šl. Materiál
97	1686			Šl. Materiál
99	1688			Šl. Materiál
100	1689			Šl. Materiál

4.2 Izolace DNA

Jako materiál pro izolaci DNA bylo obdrženo osivo máku pocházející zejména z evropského šlechtění. Materiál obsahoval krajové odrůdy, okrasné odrůdy, odrůdy novošlechtění i šlechtitelský matriál. Osivo bylo vyseto, jak je vidět na obrázku č. 6. Od každého vzorku bylo vždy vyseto minimálně 40 semen, tak aby byla pokryta variabilita v rámci odrůdy. Po 14 dnech byl materiál odebrán, vložen do papírových sáčků a sušen v silikagelu cca 1 týden.

Obr. č. 6 Výsev materiálu pro izolaci DNA

Vysušený materiál byl použit pro izolaci DNA pomocí modifikované metody CTAB-PVP, vhodnou pro rostlinný materiál (Doyle and Doyle, 1990)

4.2.1 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP

- Ve sterilních 1,5ml mikrozkumavkách homogenizovat vysušený materiál máku za použití homogenizační tyčinky a sterilního křemičitého písku
- Přidat 750µl extrakčního pufru (2x PVP-CTAB + 5%merkaptoethanol) předehřátého na 65°C, homogenizovaný materiál promíchat s extrakčním pufrem

- Nechat inkubovat 45 minut při 65°C, během inkubace promíchat každých 15 minut
- Přidat 500µl chloroformu s IAA, nechat 10 minut protřepat
- Centrifugovat na 12 000rpm po dobu 5 minut při laboratorní teplotě (21°C)
- Přepipetovat vodnou fázi do nové mikrozkumavky
- Přidat 1/5 150µl 5% CTAB a 500µl chloroformu s IAA, nechat 10 minut protřepávat
- Centrifugovat na 14 000rpm po dobu 5 minut při laboratorní teplotě
- Přepipetovat vodnou fázi do nových mikrozkumavek
- Přidat 2/3 objemu (250-300µl) ledového isopropanolu, 2-3x promíchat
- Nechat přes noc v mrazáku (-20°C)
- Centrifugovat na 14 000rpm po dobu 5 minut při 4°C, odstranit supernatant
- Přidat 300µl TE pufru, inkubovat 45minut při 37°C
- Přidat 600µl ledového 96%etanolu
- Nechat alespoň 60 minut v mrazáku
- Centrifugovat na 14 000rpn po dobu 10 minut při 4°C, odstranit supernatant
- Přidat 1ml ledového 70 % etanolu, centrifugovat na 14 000rpm po dobu 2 minut při 4°C, odstranit supernatant (tento krok 2-3x opakovat)
- Vysušit pelet
- Přidat 100µl TE pufru a nechat rozpustit při 37°C
- DNA uchovat při -20°C

4.3 Kontrola kvality DNA na agarosovém gelu

Při využití této metody by na gelu měl být vidět jeden výrazný band/pruh o velikosti několika kbp. Přítomnost menších fragmentů (tzv. smearu) poukazuje na fragmentovanou (degradovanou) DNA nebo nedostatečně odstraněnou RNA. Na obr. č. 7 je vidět kvalita DNA u vybraných vzorků.

Příprava agarosového gelu

Kontrola kvality DNA probíhá na agarosovém gelu o koncentraci 0,8%.

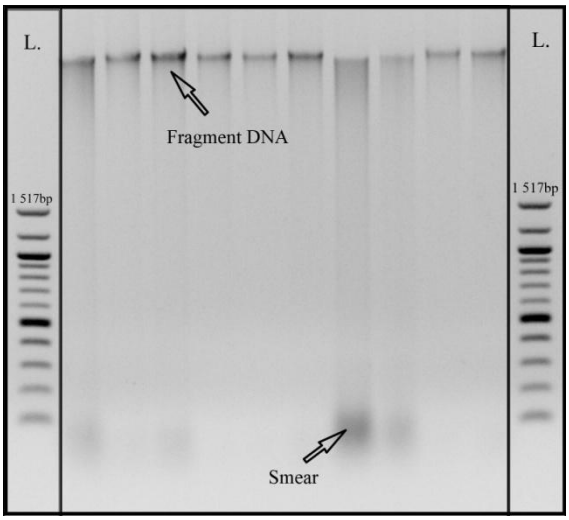
- Navážit 0,8g agarosy
- Přidat 100ml TBE pufru, promíchat
- Rozpustit agarosu zahřáním, průběžně promíchávat dokud není roztok homogenní
- Zchladit pod tekoucí vodou na 50-60°C a přidat 4ml EtBr, promíchat a nalít do předem připravené vany s hřebínkem
- Nalitý gel nesmí obsahovat vzduchové bubliny
- Po ztuhnutí gelu vyjmout hřebínek, který vytvoří sloty

Příprava vzorku pro testování kvality DNA

- Nanést na parafilm 2µl bromfenolové modři
- Do připravené kapky přidat 5µl vzorku, několikrát propipetovat
- Napipetovat 5µl směsi na gel

Gelová elektroforéza

- Ztuhlý gel vložit do elektroforetické vany s TBE pufrem
- Napipetovat připravené vzorky na gel
- Připojit elektroforetickou vanu ke zdroji
- Zapnout zdroj el. napětí na 90V po dobu 2 hodin
- Jako velikostní standart byl použit 100bp DNA ladder (NEB)
- Vizualizace proběhla pomocí ethidium bromidu pod UV světlem a vyhodnoceno v programu GeneSys (Cambridge, UK)

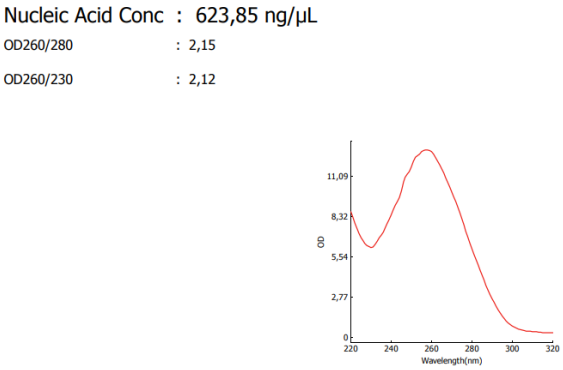


Obr. č. 7 Kontrola kvality DNA na agarosovém gelu

4.4 Kontrola koncentrace izolované DNA

Pro zjištění koncentrace DNA a dalších různých parametrů se používá mnoho různých přístrojů. Pro kontrolu izolované DNA výše uvedených vzorků byl použit BioSpec Nano od firmy Shimadzu.

- Na detekční plochu bylo napipetováno 1,5µl TE pufru – slepý vzorek
- Nadále se na detekční plochu naneslo vždy 1,5µl vzorku, u kterého byla změřena koncentrace



Obr. č. 8 Ukázka výsledku z přístroje BioSpec Nano

Na obr. č. 8 je výsledek koncentrace DNA u vzorku č. 1. Vpravo je výstup ve formě grafu, kdy na ose X je uvedena vlnová délka (nm) a na ose Y číslo OD. Vlevo je vypočtená koncentrace izolované nukleové kyseliny, v tomto případě

623,85ng/µl. Poměr absorbance 260 nm a 280 nm udává čistotu izolátu. Poměr by se měl pohybovat od 1,8 do 2, pokud je poměr nižší než 1,8 může to znamenat přítomnost bílkovin. Číslo OD 260/230 se používá jako sekundární měření čistoty a mělo by se pohybovat v rozmezí od 2 do 2,2. Je-li tento poměr výrazně nižší, může to signalizovat přítomnost kontaminujících látek (např. sacharidy, fenoly…).

4.5 PCR

4.5.1 Optimalizace složení PCR reakce

Celkový objem při PCR reakci bylo 25µl. Reakce probíhala v přístroji Termocykler Bioer. Při optimalizaci byly testovány dva teplotní cykly a tři master mixy: Master mix PPP od firmy TopBio, Master mix GoTaq® od firmy Promega, Master mix NEB OneTaq od firmy BioLabs.

Složení PCR reakce:

- 12,5µl Master Mix
- 10,3 µl PCR vody
- 0,5 µl každého primeru (10pmol)
- 0,2 µl BSA
- 1 µl DNA (150 ng/µl)

Tabulka č. 5 Teplotní profily PCR použitých při optimalizaci

PCR A (Celik, 2014)	Počáteční denaturace		5 min	94°C
	40 cyklů	Denaturace	45 s	94°C
		Annealing	1 min	55°C
		Elongace	1 min	68/72°C *
	Závěrečná elongace		5 min	68/72°C *
	Uchovávání		∞	4°C
PCR B (Mičianová, 2017)	Počáteční denaturace		5 min	94°C
	30 cyklů	Denaturace	30s	94°C
		Annealing	45s	58°C
		Elongace	45s	68/72°C *
	8 cyklů	Denaturace	30s	94°C
		Annealing	45s	53°C
		Elongace	45s	68/72°C *
	Závěrečná elongace		10min	68/72°C *
	Uchovávání		∞	4°C

*Při použití Master Mixu NEB OneTag byla nastavena teplota elongace a závěrečné elongace na 68°C

Použité primery:

Tabulka č. 6 Primery vybrané k hodnocení genetické diverzity

Primer	Sekvence primeru ´5-3´	Cyklus	Očekávaná velikost fragmentů	Autor
Ps clone BAC179L19	ATCATTGGTATGAATGTGTT GTTCACGCATTTACTTATTT	B	182, 186	Mičianová (2017)
psom 17	AAACAATCACTGACTACTCG GTAGTGGGTTTTAGGAGTTT	A	141, 142, 144	Mičianová (2017)
Ps Cor2	CTTGAAAAATATCAGTGAGC TAATTGGCAGAGAAGAAGTA	B	180, 182	Mičianová (2017)
psom4	GCAGAAGATGAAAAGTTAAA TCTCTTATTGCTGTTCAGTT	A	143, 152, 158	Mičianová (2017)
Ps SalSyn	GAAGATGCTTGATCTTAGTG GAAAAGAAGGAGGAATTTAT	B	192, 193, 195, 197	Mičianová (2017)
psSSR44	ATCATCCACATCCCATTTT CACTATCATCCAGATCACCAC	A	198, 200	Mičianová (2017)
psSSR57	GGCATAGAGGCTTCATCTACT GAAGGGGTGTTGTATGTGTAG	A	199, 200, 212	Mičianová (2017)
psSSR69	ATAGATTTATTTTGGCCACCT CACCTATTGATTGAGGATGAA	A	155, 156, 157	Mičianová (2017)
psSSR003	CACCACTGGTCTTGAATCTC CTCTTCCCACCACACTCTTA	A	-	Celik (2014)
psSSR003 (1)	AGTGATGGGTTAGTGATTTGA ACAACACCCAAATCTATTTCA	A	-	Celik (2014)

4.5.2 Gelová elektroforéza

PCR produkt byl nanesen na 3% agarosový gel. Gel byl připravován pomocí agarosových tablet od firmy SERVA rozpuštěných ve 100ml 1x TBE pufru a přidáním 6ml EtBr jako interkalačního činidla. Elektroforéza probíhala v horizontální elektroforetické vaně s TBE pufrem nejdříve při 90V po dobu 5 minut, a poté při 120V po dobu 85 minut. Jako velikostí standart byl použit Low Molecular Weight DNA Ladder od firmy BioLabs. Fragmenty byly vizualizovány pod UV světle a zpracovány v programu GeneSys.

4.5.3 Čipová elektroforéza

Pro optimalizaci byla použita čipová elektroforéza MultiNa od firmy Shimadzu zobrazená na obr. č. 9. Jedná se o typ, který nanáší vzorky automatickým ramenem a je schopen analyzovat až 108 vzorků najednou. Pro analýzy jsou firmou dodávány kity umožňující analýzu fragmentů velkých až 12 kpb (Shimadzu,2007).

Obr. č. 9 MultiNa od Shimadzu (Shimadzu, 2007)

4.5.4 Optimalizace fragmentační analýzy

Z objemu 25µl PCR reakce bylo 10µl PCR reakce naneseno na 3% agarosový gel pro kontrolu vzniklého produktu a 15µl bylo odesláno na následnou fragmentační analýzu do firmy SEQme. Pro optimalizaci byl použit primer značený fluoforem 6-FAM. Teplotní profil PCR a master mix byl zvolen dle vybraného primeru. Bylo testováno různé složení reakcí. Složení jednotlivých PCR reakcí použitých při optimalizaci, včetně přidaných aditiv ($MgCl_2$ a BSA) a různé koncentrace DNA i primerů, jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7 Složení PCR reakce použitých při optimalizaci fragmentační analýzy

	Reakce1	Reakce2	Reakce3	Reakce4	Reakce5	Reakce6	Reakce7
Master mix	12,5µl	12,5µl	12,5µl	12,5µl	12,5µl	12,5µl	12,5µl
Primer F	0,5µl	0,5µl	1µl	1µl	1µl	0,4µl	0,2µl
Primer R	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,4µl	0,2µl
BSA/$MgCl_2$	0,2µl*	-	-	0,2µl*	0,2µl	-	-
H_2O	10,3µl	10,5µl	10µl	9,8µl	9,6µl	10,7µl	11,1µl
DNA (ředění)	1µl (1x, 10x,20x)	1µl (1x,10x,20x)	1µl (10x,20x)	1µl (10x,20x)	1µl (20x)	1µl (20x,40x)	1µl (20x,40x)

* U těchto reakcí bylo přidáno BSA nebo $MgCl_2$

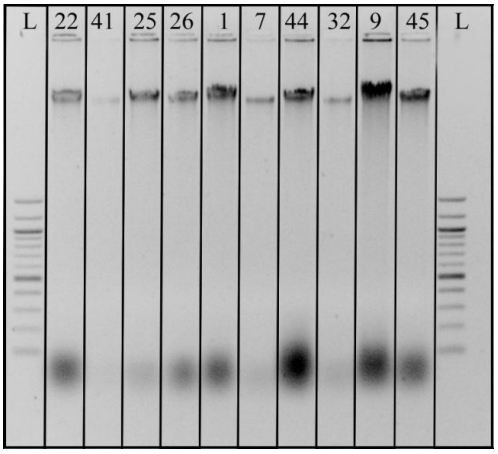
5. Výsledky práce

5.1 Kontrola kvality a kvantity izolované DNA

Kvalita a kvantita izolované DNA byla stanovována pomocí dvou kontrolních metod. První metodou byla kontrola kvality DNA na gelové elektroforéze. Druhou metodou bylo měření pomocí spektrofotometru BioSpec Nano od firmy Shimadzu, který udává koncentraci a kvalitu na základě různých vlnových délek. Na Obr. č. 10 a 11 jsou výsledky stejných vzorků pro obě použité kontrolní metody. Z níže uvedených výsledků je vidět značný rozdíl v kvalitě a koncentraci izolované DNA u každé z metod, což mohlo být způsobeno nepřesným pipetováním vzorků na agarosový gel. Například spektrofotometricky byla nejvyšší koncentrace naměřená u vzorku č. 22, ale na agarosovém gelu byla nejvyšší koncentrace u vzorku č. 9. U vzorku č. 25 a 26 naměřil spektrofotometr téměř stejné hodnoty kontaminace. Na gelu je však vidět, že vzorek č. 26 má vyšší míru kontaminace.

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/µL)	OD260 /280	OD260 /230
1	22	18.10.16 12:16:25			1463,57	2,20	2,13
2	41	18.10.16 12:16:50			128,22	2,24	2,02
3	25	18.10.16 12:17:14			725,86	2,17	2,21
4	26	18.10.16 12:17:38			989,41	2,17	2,17
5	1	18.10.16 12:18:02			623,85	2,15	2,12
6	7	18.10.16 12:18:24			228,94	2,09	2,10
7	44	18.10.16 12:18:47			846,49	2,16	2,06
8	32	18.10.16 12:19:10			239,17	2,06	2,06
9	9	18.10.16 12:19:31			450,34	2,07	2,07
10	45	18.10.16 12:19:54			671,32	2,10	2,17

Obr. č. 10 Měření kvality a kvantity DNA spektrofotometricky

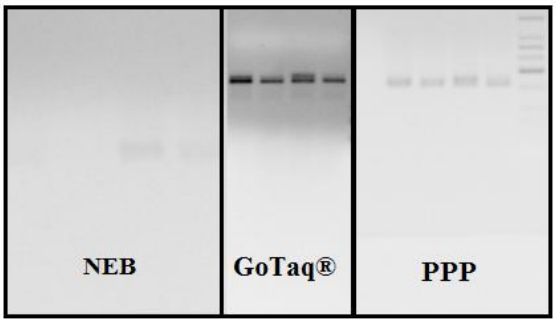


Obr. č. 11 Kontrola kvality DNA na agarosovém gelu

5.2 Testování primerů vhodných pro analýzu SSR u máku setého

5.2.1 Optimalizace pomocí gelové elektroforézy

Celkem bylo pro mák setý testováno 10 mikrosatelitových primerů: Ps clone BAC179L19, psom17, PS Cor2, psom4, Ps Salsyn, psSSR44, psSSR57, ps SSR69, psSSR003, psSSR003-1 a 3 různé master mixy. Pro optimalizaci primerů byly použity čtyři vzorky, vzorek č. 15, 3, 6 a 23. Na obr. č. 12 jsou zobrazeny výsledky optimalizace primeru psom4 se všemi třemi master mixy. V tabulce č. 8 jsou výsledky všech testovaných primerů a mastermixů.



Obr. č. 12 Výsledky optimalizace pro primer psom4 se všemi master mixy. Pro další analýzu byl vybrán v případě tohoto primeru master mix GoTaq, Při jeho použití byly fragmenty ostré a jasné.

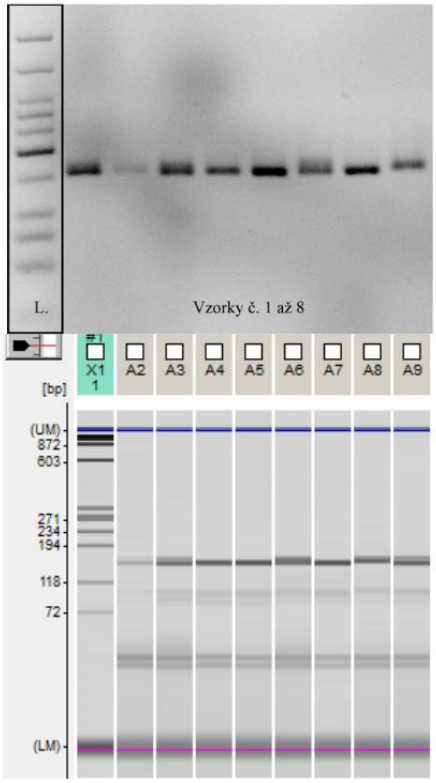
Tabulka č. 8 Výsledky optimalizace primerů

	PPP (TopBio)	GoTaq (Promega)	NEB OneTaq (BioLabs)
PsSSR69	Ostré, silné fragmenty	Rozostřené málo viditelné fragmenty	Ostré, slabě viditelné fragmenty
PsSSR44	-	Nespecifický	-
PsSSR003-1	Dva silné fragmenty	Dva rozostřené fragmenty	Dva ostré fragmenty
psom17	Rozostřený fragment	Rozostřený fragment (lépe viditelný)	Rozostřené fragmenty
PsSSR57	Dva rozostřené fragmenty	Dva ostré fragmenty	Dva ostré fragmenty
PsSSR003	-	-	Nespecifický
psom4	Slabě viditelné fragmenty	Ostré fragmenty	-
Ps clone BAC179L19	Ostré, viditelné fragmenty u vzorků 15, 6, 23	-	Ostré, viditelné fragmenty u vzorků 15, 6
Ps Cor2	Rozostřený fragment	Rozostřený silný fragment	Ostrý fragment
Ps SalSyn	-	-	-

Při použití primeru Ps Salsyn nebyl při elektroforéze detekován žádný PCR produkt ani u jednoho vzorku. U primerů PsSSR44 a PsSSR003 byla zřetelná tvorba nespecifických fragmentů. Primer Ps clone BAC179L19 se při dalších analýzách ukázal jako vysoce nestabilní.

Jako vhodné primery pro analýzu mikrosatelitů u máku setého byly vybrány primery PsSSR69, PsSSR003-1, psom17, Ps SSR57, psom4 a Ps Cor2. Pro vybrané primery byl na základě výsledků optimalizace zvolen vhodný master mix. Mater mix PPP (TopBio) byl zvolen pro primer Ps SSR69, master mix GoTaq (Promega) pro primery psom17 a psom4 a pro primery PsSSR003-1, PsSSR57 a Ps Cor2 byl zvolen master mix NEB One Taq (BioLabs).

Z obr. č. 13 nahoře je zřejmé, že rozsah dělení produktů na gelové elektroforéze byl nedostatečný z důvodu malého velikostního rozdílu jednotlivých fragmentů. Z tohoto důvodu byla pro další analýzy použita čipová elektroforéza, jejíž výsledek je vidět na obr. č. 13 dole. Písmenem L. je značen velikostní standart. V tomto případě se jedná o Low Molecular Weight DNA Ladder od firmy BioLabs.

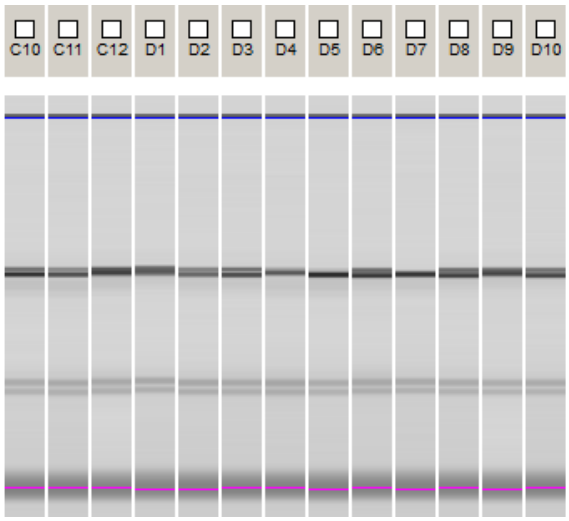


Obr. č. 13 Výsledek gelové a čipové elektroforézy primeru psom4 u vzorků č. 1 - 8

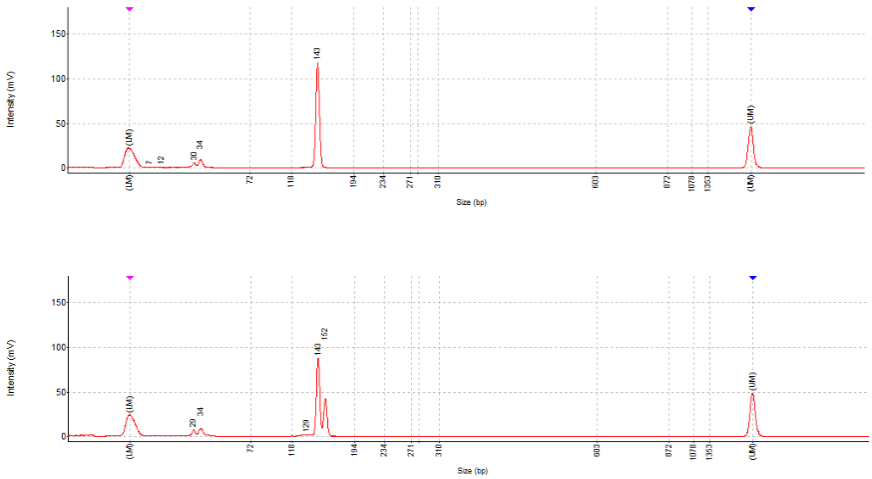
5.2.2 Výsledky z čipové elektroforézy

Analýza všech 85 doručených vzorků proběhla na čipové elektroforéze MultiNa od firmy Shimadzu s použitím kitu DNA-1000 vhodný pro produkty v rozmezí 100 až 1000bp. Čipová elektroforéza poskytuje zobrazení bandů totožných s gelovou elektroforézou. Na obr. č. 14 jsou fragmenty u vzorků č. 32 až 67 při použití primeru psom4. Jedním z výstupů čipové elektroforézy je zobrazení výsledné analýzy formou píků, které jsou separovány na základě migračního času (Obr. č. 15). Na základě výsledků čipové elektroforézy byly stanoveny výsledné velikosti bandů pro jednotlivé primery.

Při analýze primeru Ps Cor2 s master mixem NEB One Taq na čipové elektroforéze docházelo k opakujícím se chybám zobrazení. Proto byla analýza provedena znovu s master mixem Promega, u kterého již k chybám zobrazení nedocházelo. Na základě získaných dat jednotlivých primerů byla vytvořena binární matice.



Obr. č. 14 Čipová elektroforéza – bandy, vzorky č. 32- 42



Obr. č. 15 Čipová elektroforéza – křivka pro vzorky č. 40 a 78 primer psom4 - – při porovnání obou vzorků jsou u vzorku č. 78 jasně vidět dva píky o velikosti 143 a 152 kb oproti vzorku č. 40, kde je jeden pík o velikosti 143 kb

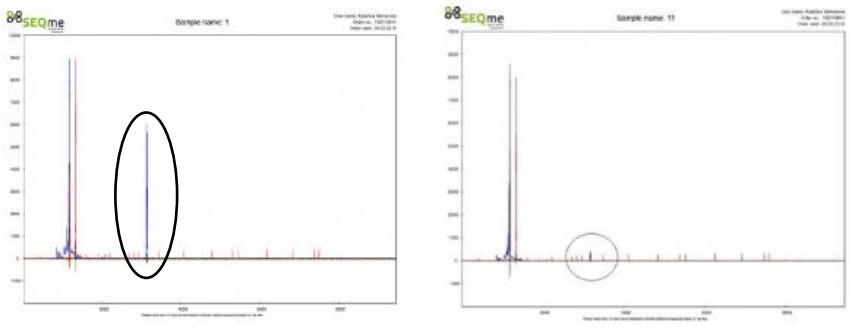
5.2.3 Výsledky optimalizace fragmentační analýzy

Pro fragmentační analýzu bylo potřeba použít fluorescenčně značené primery (Tabulka č. 9). Pro optimalizaci byl vybrán primer Cor2 s teplotním profilem PCR B se vzorkem č. 3, jehož výchozí koncentrace byla 213,69ng/µl. Na obr. č. 16 vlevo je výsledek reakce s množstvím 0,4µl každého primeru s 20x ředěnou DNA. Při této reakci byla použita vysoká koncentrace DNA, díky které docházelo k vysoké emitaci. Výsledný pík je příliš vysoký, což by mohlo způsobovat problém při hodnocení. Vpravo je výsledek s množstvím 0,2µl každého primeru s 20x

naředěnou DNA. Tato reakce a koncentrace DNA budou zvoleny i pro analýzy ostatních vzorků s ostatními primery. U ostatních reakcí bylo množství PCR produktu příliš vysoké nebo nízké.

Tabulka č. 9 Barevné značení primerů pro fragmentační analýzu

Primer	Barevné značení
psom4	ATTO 532 (VIC)
psom17	ATTO 550 (NED)
psSSR69	ATTO 550 (NED)
psSSR003-1	6-FAM
Ps Cor2	6-FAM
psSSR57	ATTO 532 (VIC)

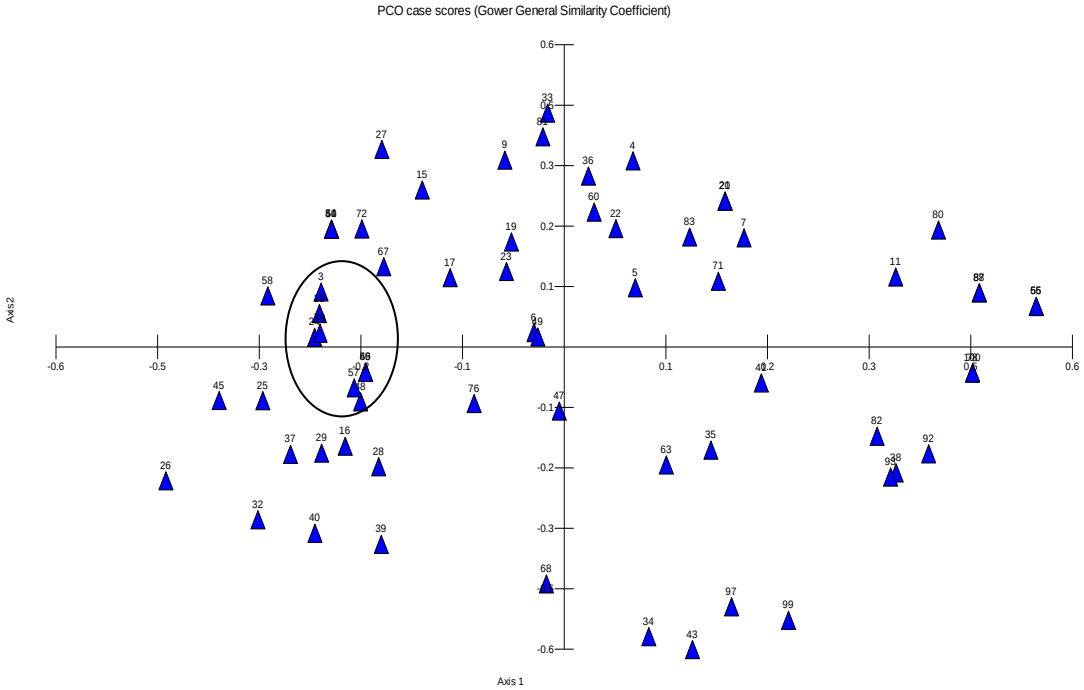


Obr. č. 16 Výsledek fragmentační analýzy pro reakci č. 6 a 7

5.3 Výsledky SSR analýzy

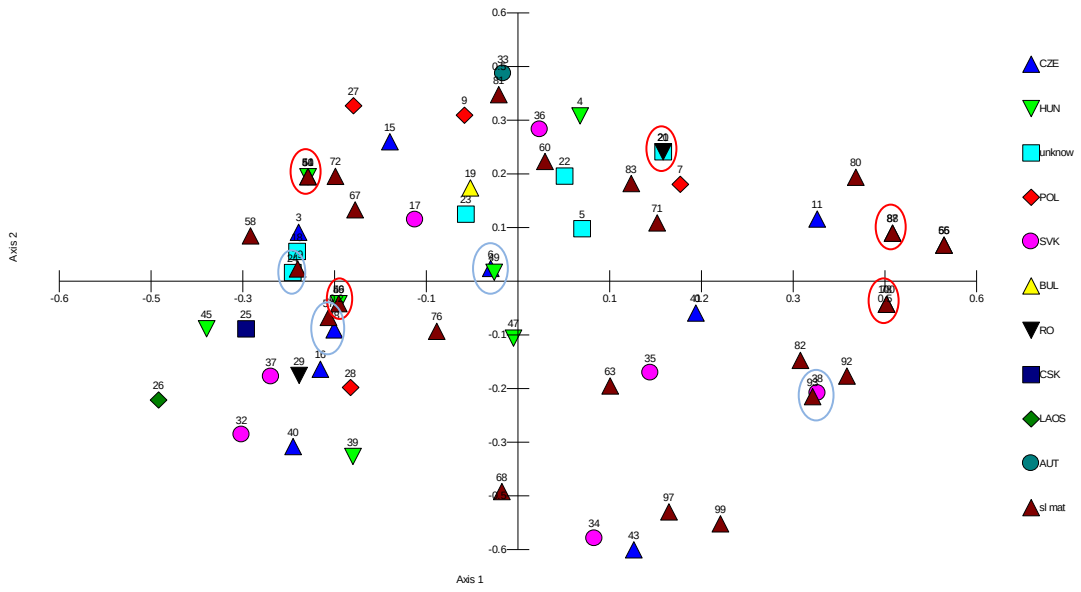
Pro analýzu genetické diverzity genových zdrojů máku bylo v roce 2018 doručeno 85 vzorků. Do výpočtu binární matice bylo však zahrnuto pouze 60 vzorků. U vzorků č. 1, 2, 8, 10, 12, 13, 14, 30, 31, 42, 69, 70, 74, 77 a 85 nebylo možné u některých primerů provést skórování ani po opakovaných analýzách.

Celkem bylo použito 6 mikrosatelitových primerů: psom4, psom17, psSSR69, psSSR003-1, Ps Cor2 a psSSR57. Na základě získaných dat výše zmiňovaných primerů byla vytvořena binární matice přítomnosti (1) a nepřítomnosti (0) fragmentů u všech vzorků. Data byla vyhodnocena v programu MVSP za použití PCO analýzy. Nadále byla vypočtena matice podobnosti mezi jednotlivými vzorky.



Graf č. 2 PCO - všechny vzorky

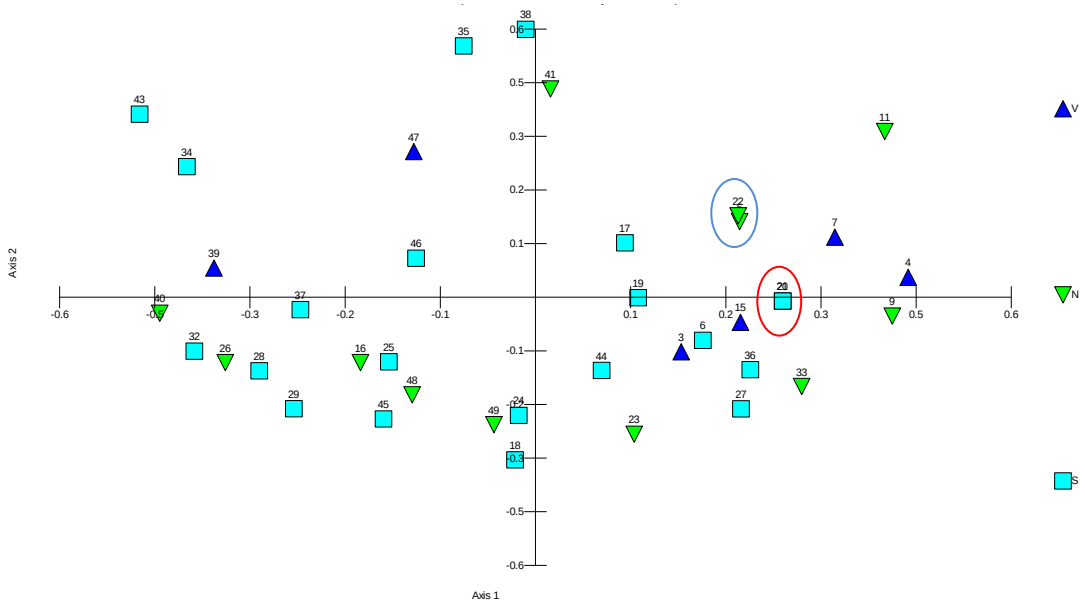
Z grafu č. 2 lze vyčíst genetickou vzdálenost mezi všemi analyzovanými vzorky. V grafu je označeno místo vzorků, které vykazují vyšší míru shody. Jedná se o vzorky č. 3, 8, 18, 24, 46, 48, 57, 60 a 79. Jedná se o odrůdy Bílý vanilkový, Orbis a Ruski obri původem z České republiky, nadále jsou do této skupiny zařazeny odrůdy Strube, Prejmer bílý neznámého původu, maďarská odrůda HUNZAL-10/59 a šlechtitelský materiál. Jedná se o odrůdy s nízkým až vysokým obsahem alkaloidů. U ostatních vzorků je patrná vysoká míra genetické variability.



Graf č. 3 PCO analýza – všechny vzorky rozdělené na základě země původu

V grafu číslo 3 jsou vzorky rozlišeny barevně dle zemí původu. Je vidět, že v jednotlivých zemích je genetická variabilita vybraných vzorků vysoká. V grafu vidíme, že některé vzorky vykazují 100% shodu (červeně značené). Jedná se o vzorky č. 20 (Cluj A) a 21 (Yonne), 44 (HUNBAL-09/6), 50 a 51 (ŠM), 46 (HUNZAL-10/59) a 60 (ŠM), 87(ŠM) a 88(ŠM), 78(ŠM) a 100(ŠM). Některé vzorky vykazují vysokou míru podobnosti (modře značené), a to vzorky č. 24 (Prejmer bily) a 79 (ŠM), 6 (Modrý Valašsko) a 49 (Ametiszt), 38 (Bergam) a 93(ŠM), 48 (Rusky obri) a 57 (ŠM).

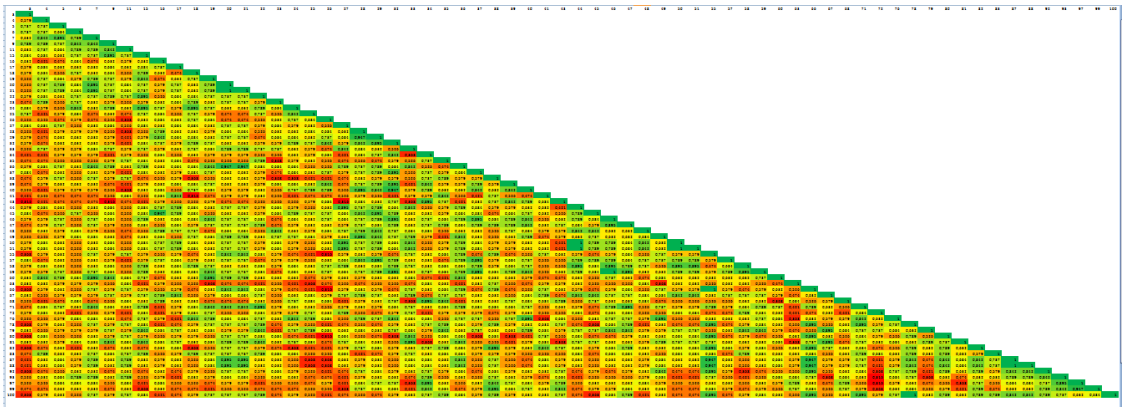
Nejčastěji se jedná o vysokou podobnost mezi odrůdou a šlechtitelským materiálem (ŠM). U odrůdy Yonne není známa země původu. Díky podobnosti s odrůdou Cluj A pocházející z Rumunska, můžeme předpokládat původ ve stejné nebo podobné oblasti. Odrůda Modrý Valašsko, která je krajovou odrůdou pocházející z České republiky je velmi podobná s odrůdou Ametiszt pocházející z Maďarska. Ale komplexně šlechtitelský materiál je rovnoměrně rozložen po celém grafu.



Graf č. 4 PCO analýza - Odrůdy barevně rozdělené na základě obsahu alkaloidů

V grafu č. 4 bylo pro analýzu použito 39 odrůd se známým obsahem alkaloidů. Odrůdy byly rozděleny do třech skupin, nízkoalkaloidové značené N, středněalkaloidové značené S a vysokoalkaloidové značené V. Vysoká podobnost je u vzorků č. 5 (Hen and chicken) a 22 (Boehmuv belosemenny). Vzorky č. 20 (Cluj A) a 21 (Yonne) vykazují absolutní shodu. Nejvzdálenější vzorky, lišící se od většiny odrůd jsou vzorky č. 11, 34, 35, 38, 43 a 47. U jedné z hypotéz se předpokládalo, že ke shlukování dochází dle obsahu alkaloidů. Na základě použití šesti SSR primerů se tento předpoklad nepotvrdil. Při použití více SSR primerů by mohlo dojít ke zpřesnění analýzy.

Dalším a hlavním výstupem byl výpočet matice podobnosti na základě binární matice. Celkem bylo do výpočtu matice podobnosti zařazeno 60 vzorků. Několik vzorků vykazovalo maximální hodnotu shody 1, tedy 100%. Byly to vzorky č. 20 a 21, 44 a 50 a 51, 46 a 59, 55 a 66, 78 a 100, 87 a 88. Naopak nejnižší shoda 0,316, tedy 31,6% byla u analyzovaných vzorků č. 3 a 43, 9 a 43, 18 a 41, 27 a 43, 26 a 55, 26 a 66, 26 a 80, 72 a 93, 72 a 97. Průměrná hodnota genetické shody činí 0,658.

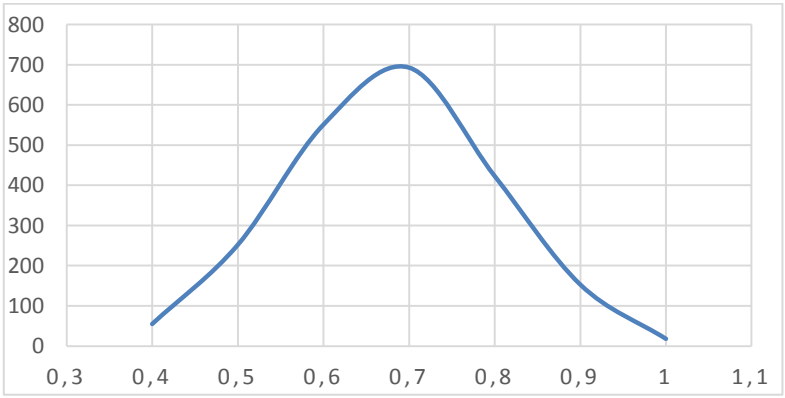


Obr. č. 17 Barevně znázorněná shoda mezi vzorky

Na obr. č. 17 jsou barevně rozděleny všechny analyzované vzorky. Dle barev lze rozlišit míru genetické shody jednotlivých vzorků. Zelená barva značí vzorky s nejvyšší shodou, naopak červená barva značí vzorky s nejnižší genetickou shodou. Vzorky resp. porovnávané dvojice červené barvy vykazují nejvyšší míru genetické odlšnosti, a proto budou vhodné pro další šlechtění.

Dle barevného spektra je patrné, že velkou část zabírá červená, oranžová a žlutá barva, tedy v analyzovaném souboru byla detekována vyšší míra genetické odlišnosti.

Výsledná matice byla poskytnuta šlechtitelům, na jejichž základě je možné ve spojení s fenotypovými daty vybrat vhodný materiál pro šlechtění.



Graf č. 5 Četnost hodnot genetické shody

Na základě výsledků vypočtené matice podobnosti byl vytvořen graf četností vyskytujících se hodnot genetické shody. Dle grafu č. 6 je patrné, že nejvíce kombinací se pohybuje v rozmezí genetické shody 0,6 až 0,7, tedy 60 - 70%.

6. Diskuse

Cílem diplomové práce bylo pomocí SSR analýzy odlišit 85 genových zdrojů máku setého. Výsledky budou předány šlechtitelům, kteří na jejich základě použijí vhodné kombinace genotypů do dalšího šlechtění.

DNA byla izolována ze sušeného, směsného vzorku vypěstovaného z osiva pomocí metody CTAB dle Doyle and Doyle (1990). Izolace pomocí CTAB je časově náročná, ale levná metoda. DNA izolovaná touto metodou vykazuje dostatečnou koncentraci, čistotu a stabilitu. Achaeya et. al. (2009) a Gülşen et. al. (2014) používali pro izolaci DNA metodou CTAB čerstvé listy z jedné rostliny, což nemusí dostatečně pokrýt variabilitu v rámci odrůdy. Proto je vhodnější vytvořit směsný vzorek jako např. při své práci použil Celik et. al. (2016). Tato metoda izolace byla též využita i v práci Saunders et. al. (2001) pro metodu AFLP. Khatik et. al. (2017) využíval pro metodu RAPD izolaci pomocí metody CTAB z listové tkáně jednotlivých rostlin zmražených tekutým dusíkem a rozemletých v třecí misce.

Další možností izolace DNA z máku setého je pomocí komerčně vyrobených kitů. Mičianová et. al. (2017) použila pro izolaci kit Plant DNeasy Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA). Fermentas Genomic DNA Isolation Kit (Fermentas, USA) používal pro izolaci Gülşen et. al. (2014), který uvádí koncentraci izolované 100ng/µl. Izolace DNA pomocí kitů je ale velice nákladná a pro dlouhodobé uchování není vhodná, DNA rychle degraduje.

Analýza SSR se jeví jako vhodný nástroj používaný pro analýzu polymorfismu různých taxonů. Tuto analýzu lze použít u studia bakteriální taxonomie (Coletta-Filho et. al., 2001), a také pro analýzu SSR dynamiky u hub (Singh et. al. 2011). SSR se využívá k analýze variability různých zemědělských plodin jako například pšenice, slunečnice, sója, brambory a rýže (Song, 2005; Zia, 2014; Bisen, 2015; Wang, 2017; Rashmi, 2017).

Jako první uvedl studii využívající EST-SSR markery u opiového máku Lee (2011). Při této studii bylo vyvinuto celkem 22 EST-SSR markerů. Šest těchto polymorfních primerů bylo použito u 135 rostlin s vysokým obsahem alkaloidů. U primerů psom 4 a psom 17, které byly použity i v této práci, byla zjištěna přenosnost v pěti rodech *Papaver* a dvou rodech *Eschscholzieae*. Çelik (2011) ve své studii testoval 1820 potencionálních sekvencí splňujících kritéria pro návrh primerů.

Bylo navrženo 100 SSR primerů, které byly testovány na šesti odrůdách máku setého. Tato studie uvedla jako první SSR markery odvozené od genomové sekvence této plodiny.

Gülşen et. al. (2014) považuje za výhodu analýzy SSR dostupnost velkého množství sekvencí pro syntézu primerů, snadnou realizaci, kodominantní dědičnost, jedinečné místo v genomu a jako metodu produkující spolehlivé amplifikační produkty. V této diplomové práci byla zjištěna nízká genetická shoda a vysoká variabilita v analyzované skupině vzorků. Oproti tomu studie mikrosatelitů publikována Celik (2017) uvádí, že u skupiny tureckého opiového máku je genetická variability velmi nízká. Což může podpořit hypotézu, že odrůdy opiového máku mají malou genetickou základnu a proto vykazují malou variabilitu.

Saunders et. al. (2001) publikoval analýzu polymorfismu DNA u 40 vzorků máku setého metodou AFLP. K vyhodnocení genetické rozmanitosti 24 odrůd máku použil Acharya et. al. (2009) kombinaci 12 RAPD primerů a 9 ISSR primerů. Byla zde zjištěna nízká hodnota genetické rozmanitosti. Khatik et. al. (2017) prováděl analýzu genetické divezity 28 kříženců, 8 rodičů a 2 kontrolních rostlin pomocí 12 RAPD primerů. Güçlü et. al. (2014) využil k hodnocení genetické variability 17 komerčních opiových tureckých odrůd analýzy SSR a ISSR. Pro ISSR bylo použito 15 primerů a pro SSR 5 primerů. Vysoká úroveň polymorfismu u těchto dvou metod ukazuje značně vysokou genetickou variabilitu sledované skupiny odrůd. V případě RAPD a ISSR markerů není jistá jejich stabilita a opakovatelnost.

V České republice se analýzou genových zdrojů máku pomocí molekulárních markerů zabýval Horáček a Pavelková (2014). Byla sepsána metodika pro detekci a vzájemné odlišení odrůd máku, pomocí metody IRAP.

V této práci byla pro vizualizaci výsledků použita čipová elektroforéza. Čipovou elektroforézu využila taktéž při analýze mikrosatelitů u druhů *Phytophthora plurivora* a *P. taxon salixsoil* Nowakowska et. al. (2012). Využití gelové elektroforézy za použití polyakrylamidového gelu pro analýzu SSR uvádí Gülşen (2014) a Mičianová (2017). Çelik (2014) a Çelik (2017) uvádí jako metodu pro vyhodnocení SSR markeru fragmentační analýzu. Fragmentační analýza je nákladná a náročná na optimalizaci, ale opakovatelná. Oproti tomu čipová elektroforéza je

levnější, avšak ne tak přesná. Gelová elektroforéza neposkytuje dostatečnou rozlišovací schopnost u fragmentů s jednobázovým rozdílem.

V diplomové práci byly použity vzorky genových zdrojů máku z VÚO Opava. Některé vzorky vykazovaly 100% genetickou shodu. Ve většině případů se jednalo o shodu mezi odrůdou a šlechtitelským materiálem, což mohlo být způsobeno křížením geneticky podobných komponent. Pro získávání nových genotypů je dobré používat rodičovské rostliny s odlišnými znaky. Pro zpřesnění výsledků genetické variability by bylo dobré použít více SSR primerů nebo použít další molekulární metody sloužící k analýze genetické diverzity.

7. Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na analýzu genetické variability u 85 vzorků máku setého poskytnutého z VÚO Opava. Celkem bylo testováno 10 SSR primerů se třemi různými master mixy a dvěma teplotními profily PCR reakce. Na základě amplifikace a stability bylo nakonec vybráno šest SSR primerů psom4, psom17, psSSR69, psSSR003-1, Ps Cor2 a psSSR57. Těchto šest primerů celkem vytvářelo 17 fragmentů, ze kterých bylo 16 fragmentů polymorfních.

Při optimalizaci primerů byla použita gelová elektroforéza, která probíhala na 3% agarosovém gelu v TBE pufru. Rozsah dělení produktů na gelové elektroforéze byl nedostatečný z důvodu malého velikostního rozdílu jednotlivých fragmentů, a proto byla pro další analýzy použita čipová elektroforéza. Nadále byla provedena optimalizace PCR reakce s fluorescenčně značeným primerem pro fragmentační analýzu. Výsledky z fragmentační analýzy poslouží k porovnání s čipovou elektroforézou.

Do analýzy bylo použito pouze 60 vzorků. U vzorků č. 1, 2, 8, 10, 12, 13, 14, 30, 31, 42, 69, 70, 74, 77 a 85 nebylo možné u některých primerů provést skórování ani po opakovaných analýzách. U ostatních vzorků byla vytvořena binární matice přítomnosti a nepřítomnosti fragmentů. Data byla vyhodnocena pomocí programu MVSP a vytvořeny grafy pro PCO analýzu u všech vzorků. Celkem byly vytvořeny 3 grafy pomocí PCO analýzy. V prvním grafu je zobrazena genetická vzdálenost všech vzorků, ve druhém grafu je genetická vzdálenost všech vzorků rozdělených dle zemí původu a ve třetím grafu jsou zobrazeny pouze odrůdy (39 vzorků) bez šlechtitelského materiálu na základě obsahu alkaloidů. Dále byla vypočtena matice podobnosti vzorků a vytvořen graf hodnot genetické shody, který ukazuje, že nejvíce vzorků se vyskytuje s hodnotou genetické shody 0,6-0,7.

Několik vzorků vykazovalo maximální hodnotu shody 1, tedy 100%. Byly to vzorky č. 20 a 21, 44 a 50, 44 a 51, 46 a 59, 55 a 66, 78 a 100, 87 a 88. Naopak nejnižší shoda 0,316, tedy 31,6 % byla u analyzovaných vzorků č. 3 a 43, 9 a 43, 18 a 41, 27 a 43, 26 a 55, 26 a 66, 26 a 80, 72 a 93, 72 a 97. Dle vypočtené matice podobnosti bylo zřejmé, že vzorky vykazují nízkou genetickou shodou a vysokou variabilitou. Výsledky z analýz byly poskytnuty šlechtitelům a budou sloužit jako podklady pro následné křížení. Předmětem dalšího výzkumu bude zpřesnění

výsledků genetické variability pomocí dalších SSR markerů. Nadále budou použity další metody sloužící k analýze genetické diverzity.

8. Zdroje

- Almanach českého a moravského šlechtění rostlin. Praha: Českomoravská šlechtitelská a semenářská asociace, 2000. 220 s.
- AL-SAMARAI, F. R.a A., A. AL-KAZAZ. Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology* (2015), **9**(3), 118-130
- ACHARYA, H.S. a V. SHARMA. Molecular Characterization of Opium Poppy (Papaver somniferum) Germplasm. *American Journal of Infectious Diseases* . 2009, **5**(2), 148-153
- BARANYK, P. a kol. *Olejniny*. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2010. 206 s. ISBN 978-80-86726-38-0.
- BECHYNĚ, M., T. KADLEC a J. VAŠÁK. *Mák*. Praha: Agrospoj, 2001. Semafor. ISBN 80-239-4237-9.
- BHARGAVA, A., F. F. FUENTES. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology*. 2010, **44**(3), 250-266
- BISEN, Anchal, Dhirendra KHARE, Priya NAIR a Niraj TRIPATHI. SSR analysis of 38 genotypes of soybean (Glycine Max (L.) Merr.) genetic diversity in India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015, **21**(1), 109-115
- BUSCHIAZZO, E., N. J. GEMMELL. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays*, 2006, **28**(10), 1040-1050
- CALIŞKAN, M., *Genetic Diversity in Plants*, Croatia: In Tech, 2012, ISBN 978-953-51-0185-7.
- ÇELIK, I. *DEVELOPMENT OF SSR MARKERS IN POPPY (Papaver somniferum L.)*. IZMIR, 2011. Thesis. Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.
- ÇELIK, I., V. GULTEKIN, J. ALLMER, S. DOGANLAR, A. FRARY. Development of genomic simple sequence repeat markers in opium poppy by next-generation sequencing. *Molecular Breeding*. 2014, **34**(2), 323-334
- ÇELIK, I., H. CAMCI, A. KOSE, F. C.KOSAR, S. DOGANLAR a A. FRARY. Molecular genetic diversity and association mapping of morphine content and agronomic traits in Turkish opium poppy (Papaver somniferum) germplasm. *Molecular Breeding*. 2016, **36**(4), 36-46
- COLETTA-FILHO, H. D., M. A. TAKITA, A. A. DE SOUZA, C. I. AGUILAR-VILDOSO a M. A. MACHADO. Differentiation of Strains of Xylella fastidiosa by a Variable Number of Tandem Repeat Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, **67**(9), 4091-4095
- DAKIN, E. E a J. C. AVISE. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 2004, **93**(5), 504-509
- DOBOS, G., Sdružení český mák informuje: *4. makový občasník*. Praha: Sdružení český mák s.r.o., 2005. ISSN 80-213-1284-X

- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990 v.12, p.13-15
- *FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations: Biodiversity*. Rome, 2018 Dostupné z: http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en/
- FEJÉR, J. BREEDING ASPECTS OF POPPY IN SLOVAKIA. *Acta Horticulturae* . 2014, (1036), 101-105
- FEJÉR J.: *Morfologicko-biologická diverzita druhu mak siaty (Papaver somniferum L.) a jej hodnotenie*. Grafotlač, Prešov 2015. ISBN 978-80-555-1334-8.
- GÜÇLÜ, G. B., T. GÜRKÖK, M. KOYUNCU, N. ARSLAN a İ. PARMAKSIZ. Genetic Characterization of Turkish Commercial Opium Poppy (Papaver somniferum L.) Cultivars Using ISSR and SSR Markers. *Journal of New Results in Science*. 2014, **1**(7), 48-57.
- GUO, L., T. WINZER, X. YANG, et al. *The opium poppy genome and morphinan production.* Science, 2018, 362(6412), 343-347
- HAVLÍČKOVÁ L., JOZOVÁ E., RYCHLÁ A., KLÍMA M., KUČERA V., ČURN V. (2014): Genetic diversity assessment in winter oilseed rape (Brassica napus L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers. Czech J. Genet. Plant Breed., 50: 216–225.
- HLAVA, B., VALÍČEK, P., Zelený, V. 2002. *Omamné drogy*, in Valíček, P. (ed.), *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Academia, Praha, 486 s.
- HAYWARD, A. C., R. TOLLENAERE, J. DALTON-MORGAN a J. BATLEY. Molecular *Marker Applications in Plants. Plant Genotyping*. New York, NY: Springer New York, 2015, 13-27
- HENRY, Ch. S., *Microchip capillary electrophoresis: methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2006 ISBN 15-974-5076-6.
- HORÁČEK, J. a M. PAVELKOVÁ. *Metodika využití molekulárních markerů IRAP pro popis genových zdrojů máku setého (Papaver somniferum L.)*. Šumperk: Agritec, 2014. ISBN 978-80-87360-31-6.
- CHEN, G., Y. LIN, J. WANG. Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*. 2006, **68**(3), 497-503
- CHLOUPEK, Oldřich. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Vyd. 3., upr. 2. Praha: Academia, 2008. Česká matice technická (Academia). ISBN 978-80-200-1566-2.
- JAHODÁŘ, L., *Farmakobotanika, semenné rostliny*, Karolinum, Praha, 2006, 258 s
- JOZOVÁ, E. *Molekulární markery jako nástroj pro hodnocení genetických zdrojů řepky a selekci autoinkompatibilních rostlin*. České Budějovice, 2017. Disertační práce. Jihočeská univerzita.

- KHATIK, C. L., S. P. SHARMA, S. R. MALOO, N. S. DODIYA, A. JOSHI a R.K. JAIN. Diversity analysis among opium poppy (Papaver somniferum L.) crosses and parents using RAPD. *Electronic Journal of Plant Breeding*. 2017, **8**(1), 17-25
- KISHORE, B., A. RASTOGI, A. SIDDIQUI, M. SRIVASTAVA, N. VERMA, R. PANDEY, N. CHANDRA a S. SHUKL. Opium Poppy: Genetic Upgradation Through Intervention of Plant Breeding Techniques. *Plant Breeding from Laboratories to Fields* [online]. InTech, 2013, (1036), 101-105
- KOH H., KWON S., THOMSON M. (2015). Current technologies in plant molecular breeding: a guide book of plant molecular beeding for researchers. *Dordrecht: Springer*, 2015. ISBN 978-94-017-9995-9.
- KAMENÍKOVÁ, L., Czech journal of genetics and plant breeding. *Mák setý (bělosemenný) Sokol*, Volume 41, Praha: ČAZV 2005, 80
- KUMAR P., GUPTA V.K., MISRA A.K., PANDEY B.K. (2009). Potentional of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Platnt Omics Journal*. 2009 **(2(4)**, 141-162.
- KUMAR S., N. a G. GURUSUBRAMANIAN, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis*, 2011, **11**(3), 116-124
- LEE E.J., JIN G.N., LEE K.L., HAN M.S., LEE Y.H. & YANG M.S. Exploiting expressed sequence tag database for the development and characterization of gene-derived simple semence repeat markers in the opium poppy (Papaver somniferum L.) for forensic applications. J. Forensic Sci. 56: 1131–1135.
- LEE, P. Y., J. COSTUMBRADO, Ch.-Y. HSU a Y. H. KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62), 71-85
- LAHIRI, Rashmi, R.K. LAL, Nupur SRIVASTAVA a Karuna SHANKER. Genetic variability and diversity in Indian germplasm of opium poppy (Papaver somniferum L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018, **8**, 41-46
- LIŠKA, M.. *Situační a výhledová zpráva olejniny*. Těšnov, Praha I: Ministerstvo zemědělství, 2017, ISBN 978-80-7434-446-6
- MAGDELDIN, S. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics, Edited by Sameh Magdeldin*. Rijeka, Croatia: InTech, 2012, ISBN: 978-953-51-0458-2.
- MIČIANOVÁ, V., K. ONDREIČKOVÁ, D. MUCHOVÁ, L. KLČOVÁ, M. HUDCOVICOVÁ, M. HAVRLENTOVÁ, D. MIHÁLIK a J. KRAIC. Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia*. 2017, **72**(6), 587-594
- MILOSEVIC, M., M. MILORADOV, S. DRAGIN a M. STEGIC. The importance and implication of genetic resources in agriculture. *Genetika* . 2010, **42**(3), 585-598
- MUHAMMAD A. N, M. A. Nawaz, M. Q. Shahid, Y. Doğan, G. Comertpay, M. Yıldız, R. Hatipoğlu, F. Ahmad, A. Alsaleh, N. Labhane, H. Özkan, G. Chung, F. S. Baloch (2018) *DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent*

advancements in genomic selection and genome editing, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32:2, 261-285

- NEWTON I. T. Zpravodajství: Objevili nejstarší české zrnko máku. Publikováno 11.4.2007, Dostupné z http://archiv.newton.cz/pr/2007/04/11/91cec83cb423e6af11ad
- NOVÁK J., 1992: Mák setý, Systematika, původ a dějiny pěstování, In: Fábry, A. (ed.), *Olejniny*. MZe ČR, Praha, s. 265-267.
- NOWAKOWSKA, J. A., T. OSZAKO, M. BORYS a K. SIKORA. Genetic Variability of Phytophthora Community in Natural Water Resources Assessed with Microsatellite DNA Markers. *Baltic Forestry*. 2012, **18**(2), 56-64.
- Nožina M., 2001: *Cesty za opiem*. Nakladatelství Lidové noviny, Praha, 262 s.
- OVESNÁ, J. a J. HODEK. *Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované papáji*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010, ISBN 978-80-7427-063-5.
- PAUN, O., P. SCHÖNSWETTER. Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. SUCHER, Nikolaus J., James R. HENNELL a Maria C. CARLES, ed. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding*, Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-2-7, s. 75-87
- POKHRIYAL, B., K. THORAT, DA. LIMAYE, YM JOSHI, VJ. KADAM a R. DUBEY. *Microsatellite markers - A novel tool in molecular genetics*. 2012, **2**(2), ISSN 2231-2781.
- PRADEEP R., M., N. SARLA, E.A. SIDDIQ. *Euphytica*. **128**(1), 9-17
- RASHMI, Deep, Prashant BISEN, Shoumik SAHA, Bapsila LOITONGBAM, Sakshi SINGH, PALLAVI a P.K. SINGH. Genetic Diversity Analysis in Rice (Oryza sativa L.) Accessions using SSR Markers. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*. 2017, **10**(4), 204-210
- SAUNDERS, J. A., M. J. PEDRONI, L. D. J. PENROSE, A. J. FIST. AFLP Analysis of Opium Poppy. *Crop Science*. 2001, **41**(5)
- Shimadzu*: Excellence in Science,* Japan, 2007, Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/lifescience/electrophoresis/mce/multina.html
- ŞELALE, H., I. ÇELIK, V. GÜLTEKIN, J. ALLMER, S. DOĞANLAR, A. FRARY a T. DEBENER. Development of EST-SSR markers for diversity and breeding studies in opium poppy. *Plant Breeding* . 2013, **132**(3), 344-351
- SEYFERT, A. L., M. E. A. CRISTESCU, L. FRISSE, S. SCHAACK, W. K. THOMAS a M. LYNCH. The Rate and Spectrum of Microsatellite Mutation in Caenorhabditis elegans and Daphnia pulex. *Genetics*. 2008, **178**(4), 2113-2121
- SINGH, Rajender, Sonia SHEORAN, Pradeep SHARMA a Ravish CHATRATH. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) dynamics in fungus Fusarium graminearum. *Bioinformation*. 2011, **5**(10), 402-404

- SHANKER, H. a V. SHARMA. Molecular Characterization of Opium Poppy (Papaver somniferum) Germplasm. *American Journal of Infectious Diseases*, 2009, **5**(2), 148-153.
- SONG, Q. J., J. R. SHI, S. SINGH, et al. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005, **110**(3), 550-560
- TÓTH, G., Gáspari, Z. and Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. Genome Research 10, 967-981.
- VAŠÁK, J., T. KADLEC a J. VAŠÁK, *Mák*. Praha, 2010. Semafor. ISBN 978-80-904011-8-1.
- VIEIRA, M. L. C., L. SANTINI, A. L. DINIZ a C. de F. MUNHOZ. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 2016, **39**(3), 312-328
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 1995, **23**(21), 4407-4414
- WANG, J., L. HOU, R. WANG, a Q. LIU. Genetic diversity and population structure of 288 potato (Solanum tuberosum L.) germplasms revealed by SSR and AFLP markers. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017, **16**(11), 2434-2443.
- *VÚO Opava: Historie stanice*. Opava, 2003, Dostupné z: http://www.oseva.cz/new/
- WEISING, K., *DN;A fingerprinting in plants: principles, methods, and applications* . 2nd ed. Boca Raton, FL, 2005, ISBN 08-493-1488-7.
- WENZL, P., E. HUTTNER, V. CAIG a K. HELLER-USZYNSKA. Diversity Arrays Technology (DArT): A generic high-density genotyping platform. In: *ResearchGate*. Canberra, Australia: Yarralumla, 2015, 105-114
- WILLIAMS, R. C., A. A. AL-KAZAZ. Restriction fragment length polymorphism (RFLP): an Introduction and Applications. *American Journal of Physical Anthropology*. 1989, **32**(S10), 159-184
- WU, D., J. QIN a B. LIN. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography*. 2008, **(1-2)** (1184), 542-59
- ZEHNÁLEK, P., P. KRAUS. *Přehledy odrůd řepky olejky jarní, hořčice bílé, máku setého, lnu olejného a kmínu kořenného 2018*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, 2018, ISBN 978-80-7401-155-9.
- ZIA, Z. U., H. A. SADAQAT, M. H. N. TAHIR, B. SADIA, B. S. BUSHMAN, D. HOLE, L. MICHAELS a W. MALIK. Estimation of genetic diversity using SSR markers in sunflower. *Russian Journal of Genetics*. 2014, **50**(5), 498-507
- ZUKALOVÁ H. a kol. (2009): *Perspektiva odbytu semen máku a jeho rizika*, Úroda 2/2009, str. 24 – 26.