



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

Bakalářská práce

Optimalizace izolačních metod a PCR metody pro identifikaci CMS u cibule kuchyňské

Autor práce: Václav Peterka

Vedoucí práce: Ing. Eva Jozová, Ph.D.

České Budějovice
2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací různých metod izolace DNA z různých typů vzorků cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) a následnou detekcí lokusu *Ms* a detekcí cytoplazmatické samčí sterility (CMS). Jednotlivé provedené typy extrakcí DNA a jejich výsledky byly mezi sebou porovnány a vyhodnoceny. Nejvyšší kvalita DNA byla izolována z listů pomocí metody CTAB-PVP. Tyto testovací vzorky se také využily pro PCR pro detekci CMS a lokusu *Ms* za použití několika různých markerů, které se mezi sebou porovnávaly. Nejvhodnější markery se následně využily v PCR pro hlavní vzorky. Izolace DNA metodou CTAB-PVP se využila i pro další izolaci DNA z hlavních vzorků cibule kuchyňské, jimiž byly dvě sterilní linie a čtyři fertillní linie. Extrahovaná DNA z těchto vzorků se nejprve využila pro detekci lokusu *Ms*. Detekce se provedla pomocí markeru AcSKP1. Vzorky byly odebírány v průběhu několika týdnů. Lokus *Ms* byl detekován u všech vzorků (C1–C6), bez ohledu na stáří rostliny. Nicméně u vzorků z linií označených jako C2, C4 a C5 byl detekován lokus *Ms* v různých podobách zygotnosti. Dále byly vzorky DNA využity pro detekci CMS v rostlinách a určil se typ CMS. Pro tuto detekci se využili markery *cob* a *orfA501*. Pomocí těchto markerů se zjistilo, že linie, které byly deklarovány jako sterilní (linie označeny C1 a C4) jsou skutečně sterilní a mají typ sterility CMS-T. U linií C2, C3 a C6, které byly označovány jako fertillní se detekovaly i sterilní vzorky. To znamená, že tyto linie nejsou 100% fertillní. U linie označené jako C5 nebyla detekována žádná sterilita ani u jednoho ze vzorků.

Klíčová slova: cibule, DNA, sterilita, PCR, elektroforéza, izolace

Abstract

This bachelor thesis deals with the optimization of different methods of DNA isolation from different types of onion (*Allium cepa* L.) samples and the subsequent detection of the *Ms* locus and the detection of cytoplasmic male sterility (CMS). The different types of DNA extractions performed and their results were compared and evaluated. The best quality DNA was isolated from leaves using the CTAB-PVP. These test samples were also used for PCR for the detection of CMS and *Ms* locus using several different markers, which were compared with each other. The most suitable markers were then used in the PCR for the main samples. DNA isolation by CTAB-PVP was also used for further DNA isolation from the main samples of onion, which were two sterile lines and four fertile lines. The extracted DNA from these samples was first used to detect the *Ms* locus. Detection was performed using the marker AcSKP1. The samples were collected over several weeks. The *Ms* locus was detected in all samples (C1–C6), regardless of the age of the plant. However, the *Ms* locus was detected in various forms of zygosity in samples from lines designated C2, C4 and C5. Furthermore, the DNA samples were used to detect CMS in plants and the type of CMS was determined. The markers *cob* and *orfA501* were used for this detection. Using these markers, it was found that the lines that were declared sterile (lines designated C1 and C4) were indeed sterile and had the CMS-T sterility type. The lines C2, C3 and C6 that were labelled as fertile were also detected as sterile samples. This means that these lines are not 100% fertile. In the line designated as C5, no sterility was detected in any of the samples.

Keywords: onion, DNA, sterility, PCR, electrophoresis, isolation

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval své vedoucí práce Ing. Evě Jozové, Ph.D. za její rady, odbornou pomoc a trpělivost během vypracovávání této bakalářské práce a také bych chtěl poděkovat svým rodičům za jejich podporu během studia.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Cibule kuchyňská (<i>Allium cepa</i> L.).....	9
1.1.1 Biologická charakteristika.....	9
1.1.2 Způsoby rozmnožování.....	9
1.1.3 Agrotechnika.....	10
1.2 Šlechtění.....	11
1.2.1 Historie šlechtění.....	12
1.2.2 Molekulární markery ve šlechtění rostlin.....	13
1.3 Samčí sterilita.....	14
1.3.1 Jaderná samčí sterilita.....	14
1.3.2 Cytoplazmatická/cytoplazmaticko-jaderná samčí sterilita (CMS).....	14
1.3.3 Typy CMS u cibule kuchyňské.....	15
1.3.4 Molekulární markery pro CMS u cibule kuchyňské.....	16
1.3.5 Využití CMS ve šlechtění cibule kuchyňské.....	17
1.4 Izolace DNA.....	19
1.4.1 Fenol-chloroformová izolace.....	19
1.4.2 Izolace pomocí komerčních kitů.....	19
1.4.3 Magnetická izolace.....	20
1.5 Polymerázová řetězcová reakce (PCR).....	20
1.6 Elektroforéza nukleových kyselin.....	21
2 Cíle a hypotézy.....	22
3 Materiál a metody.....	23
3.1 Optimalizace metod extrakce DNA.....	23
3.1.1 Rostlinný materiál.....	23
3.1.2 Extrakce DNA pomocí kitu.....	26

3.1.3	Extrakce DNA pomocí metody CTAB-PVP.....	26
3.1.4	Extrakce DNA pomocí izolačního robota MagCore.....	27
3.2	Optimalizace PCR zkušebních vzorků.....	28
3.2.1	Detekce lokusu <i>Ms</i> u zkušebních vzorků.....	28
3.2.2	Detekce CMS u zkušebních vzorků.....	30
3.3	PCR hlavních vzorků.....	32
3.3.1	Rostlinný materiál hlavních vzorků.....	32
3.3.2	Detekce lokusu <i>Ms</i> u hlavních vzorků.....	34
3.3.3	Detekce CMS u hlavních vzorků.....	35
3.4	Gelová elektroforéza.....	36
4	Výsledky.....	38
4.1	Výsledky optimalizace metod extrakce DNA.....	38
4.2	Výsledky optimalizace PCR u zkušebních vzorků.....	40
4.2.1	Výsledky detekce lokusu <i>Ms</i> u zkušebních vzorků.....	40
4.2.2	Výsledky detekce CMS u zkušebních vzorků.....	42
4.3	Výsledky PCR hlavních vzorků.....	45
4.3.1	Výsledky detekce lokusu <i>Ms</i> u hlavních vzorků.....	45
4.3.2	Výsledky detekce CMS u hlavních vzorků.....	51
4.4	Shrnutí výsledků.....	56
5	Diskuse.....	62
	Závěr.....	65
	Seznam použité literatury.....	66
	Seznam obrázků.....	71
	Seznam tabulek.....	72
	Seznam použitých zkratk.....	73

Úvod

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) je jedna z nejvýznamnějších zemědělských plodin na světě. Vzhledem k velkému obsahu vitaminů, antimikrobiálních látek a látek podporujících metabolismus se tato zelenina široce využívá v potravinářství a v tradičním léčení. Pěstování cibule kuchyňské je podmíněno mnoha faktory, jako jsou klimatické podmínky, typy pěstovaných odrůd, šlechtění a jiné. Vzhledem k měnícím se klimatickým podmínkám je nutné vytvářet dostatečně odolné odrůdy, které jsou schopné odolávat vysokým teplotám a suchu. Velkou obtíž mohou také představovat škůdci a choroby.

Nové odrůdy vznikají šlechtěním rostlin. V průběhu času se šlechtitelské metody zdokonalovaly tak, aby byly rostliny schopné odolat nepříznivým podmínkám. V případě cibule je významným způsobem šlechtění hybridizace F_1 hybridů. U tohoto typu šlechtění lze využívat jevu zvaný cytoplazmatická samčí sterilita (CMS). Tento jev se vyskytuje u velkého množství rostlinných druhů. Způsobuje sterilitu pylových zrn. Cytoplazmatická samčí sterilita je geneticky podmíněna. V případě cibule lze tohoto jevu využít a tím výrazně zrychlit proces získávání nových odrůd. V tomto typu šlechtění hrají velkou roli molekulární markery. Výzkum molekulárních markerů patří mezi významné součásti studia molekulární biologie a využívají se v něm komplexní analýzy. Následné uplatnění těchto molekulárních markerů v zemědělství velice usnadňuje selekci různých rostlin a linií a podle toho se lze rozhodnout, které rostliny se využijí pro hybridizaci a které nikoliv.

V této práci jsem se zabýval optimalizací různých typů extrakcí rostlinné DNA a následnou optimalizací PCR pro detekci lokusu *Ms*, který je udržovatelem sterility a fertility rostlin cibule kuchyňské a optimalizací PCR pro detekci cytoplazmatické samčí sterility (CMS) a určením typu CMS u různých linií rostlin cibule kuchyňské. Detekce byla provedena pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) a byly využity molekulární markery AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a AcPMS1 (Kim a kol., 2015) pro detekci lokusu *Ms* a markery *cob* (Sato, 1998), *orfA501* (Engelke a kol., 2003) a *orf725* (Kim a kol., 2009) pro detekci CMS.

1 Literární přehled

1.1 Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.)

Cibule patří mezi nejstarší kulturní rostliny. Písemné záznamy dokládají, že ji znali již starověcí Egypťané a Řekové. Podle těchto záznamů měla pro starověké Egypťany dokonce až posvátný charakter (Vlček a kol., 1966).

Cibule má vysoký obsah vitamínu C, který může pomoci regulovat imunitní zdraví, produkci kolagenu a vstřebávání železa. Dále je to silný antioxidant, který může pomoci ochránit buňky před nestabilními a škodlivými molekulami nazývanými volné radikály. Cibule má velké množství vitamínu B, včetně folátu a vitamínu B₆. Tyto látky jsou velice důležité v metabolismu a pro funkci nervového systému. Přispívají také do tvorby červených krvinek (Kubala, 2018).

1.1.1 Biologická charakteristika

Cibule kuchyňská může být dvouletou nebo tříletou rostlinou. Během růstu vytváří v prvním nebo druhém roce cibuli různých tvarů. Tvar cibule je dán odrůdou. V následujícím roce, poté co projde jarovizací, rostlina začíná kvést a nakonec tvoří semena (Vlček a kol., 1966). Je to bylina s velkou kuželovito vřetenovitou nebo sférickou mnohošupinatou cibulí. Trubkovitý stonek je vysoký 30 – 100 cm. Listy jsou jednoduché a šedozelené. Zdužnatělé spodní části listových pochev (suknice) utvářejí cibuli. Květenství je kulovité. Okvětí je bělavé s široce kopinatými okvětními lístky. Květ obsahuje šest tyčinek a pestíky s jednou čnělkou (Kresánek, 1977; Pekárková 2005).

1.1.2 Způsoby rozmnožování

U rostlin se rozlišují tři základní způsoby rozmnožování – nepohlavní (amixie), pohlavní (amfimixie) a apomiktické (apomixie).

Nepohlavní (amiktické) rozmnožování (též vegetativní rozmnožování) je typ rozmnožování probíhající pomocí rozmnožovací buňky a nebo ze složitější části těla mateřské rostliny. Noví jedinci jsou klony mateřské rostliny (jsou genotypově shodné). Cibule kuchyňská vytváří během růstu cibule, které jsou metamorfovanými listy. Z těchto cibulí lze vypěstovat nové jedince a proto se používají pro nepohlavní množení.

V průběhu nepohlavního množení často vznikají mutace, které mohou měnit morfologické a fyziologické vlastnosti rostliny.

Pohlavní (amfimiktické) rozmnožování zajišťuje genetickou rozmanitost. U cibule kuchyňské jsou reprodukční orgány součástí květu. K oplození dochází při přenosu pylu na pestík a po splynutí pohlavních buněk a jejich jader vzniká diploidní zygota a endosperm (ze zárodečného vaku).

Apomiktické rozmnožování je odvozeno od pohlavního množení. Dochází k nepohlavnímu množení semeny, aniž by splynuly samčí a samičí gamety. Vzniklé rostliny jsou klony mateřské rostliny a jsou genetické shodné (Řepková, 2013).

1.1.3 Agrotechnika

Pro cibuli kuchyňskou jsou nejvhodnější lehčí a propustnější půdy, jejichž teplota se pohybuje do 20 °C. Vlhké půdy by mohly způsobit bakteriální hniloby. Orientace pěstebních řádků je doporučena ve směru východ → západ. Je upřednostňováno pěstování ze semene, jelikož tím lze omezit rozvoj virové žluté zakrslosti a krčkové hniloby cibule. Osivo musí mít dobrou semenářskou hodnotu a musí být viruprosté (Kocourek a kol., 2016). Semena cibule se sejí do hloubky 2 – 3 cm (Večeřová, 2010). Semena starší 24 měsíců se nedoporučuje zasévat. Záhony nesmějí být přehuštěny, jinak se mohou v porostu vyskytnout houbové choroby.

V průběhu vegetace je vhodné pravidelně měřit hodnotu pH a obsah živin v půdě. Na základě těchto měření je stanoven vhodný postup hnojení (Kocourek a kol., 2016). Podle webu AgroBio Opava, s.r.o. (online – <https://agrobio.cz/poradna/clanek/69>) se jako hnojení používají průmyslová hnojiva s obsahem základních prvků, jako je dusík, fosfor a draslík. Mezi ostatní prvky využívané v hnojení se používají vápník, síra, hořčík a stopové prvky (bór, mangan, železo, zinek, měď a molybden).

Během vegetace se také doporučuje průběžně odstraňovat napadené rostliny a pomocí vhodných postupů odstraňovat plevely z porostu.

Cibule má velmi omezenou konkurenční schopnost, zejména když je pěstována ze semene. Její počáteční růst a vývoj jsou pomalé, což způsobuje, že půda zůstává déle bez vegetace. To umožňuje plevelům růst po celou dobu vegetace (Kocourek a kol., 2016).

Vlček a kol. (1966) uvádí, že nejčastějším ukazatelem dozrávání cibulí je zasychání natě od špiček a postupné ohýbání listů směrem k zemi. Nejčastěji se se sklizní vyčkává až do doby, kdy jsou cibule řádně zataženy tj. vyzrálé.

Pro skladování cibule je nutné, aby sklady byly dostatečně vydesinfikovány a relativní vzdušná vlhkost by se měla pohybovat okolo 60 – 70 %. V případě vyšší vlhkosti by se mohly na cibulích vyskytnout skládkové hniloby. Skladované cibule by neměly být poškozeny, protože rány způsobené např. mechanizací mohou být vstupním místem pro choroby. Cibule, které byly vypěstovány ze sazečky, jsou často náchylnější na skládkové choroby. Teplota ve skladu by měla být 0 – 2 °C (Kocourek a kol., 2016).

1.2 Šlechtění

Šlechtění zeleniny a ovoce je obecně ovlivněno poptávkou velkopěstitelů a malopěstitelů. Velkopěstitelé se více zaměřují na vlastnosti rostlin, které usnadňují pěstování pro komerční využití. Mezi tyto vlastnosti patří například vyrovnanost porostu, možnost mechanizované sklizně, posklizňové úpravy, odolnost a jiné. Malopěstitelé se více zaměřují na vlastnosti jako je časná sklizeň, probírka nebo postupné sklizení (Pekárková, 2004).

V případě cibule je pokrok ve šlechtění více pozadu než u jiných druhů zeleniny. To je způsobeno mnohými faktory jako například dvouletým životním cyklem, inbreedingovou depresí, outbreedingem, vysokou úrovní heterozygotnosti, křížovým opylováním, velikostí genomu a řídkým výskytem selekčních markerů (Mahajan a Gupta, 2023).

Důležitým faktorem, který ovlivňuje způsoby šlechtění je změna klimatu, která se projevuje mírnějšími zimami, časnějším nástupem suššího jara a suchým létem. To vede ke ztrátám výnosů (Pečinka, 2020). Velký význam mohou představovat krajové odrůdy, které by mohly být využity pro šlechtění odrůd odolných vůči klimatickým změnám (Mahajan a Gupta, 2023).

Konvenční postupy šlechtění, jako jsou křížení, genové zdroje divokých druhů poskytující rezistence různých typů nebo tvorba rostlin regenerací pylu, dnes již nedokáží uspokojit poptávku po velkém množství kvalitních plodin (Pečinka, 2020). Z toho důvodu je nutné vylepšit šlechtitelský program pomocí pokročilých

šlechtitelských technik, molekulárních nástrojů a genomových dat (Mahajan a Gupta, 2023).

1.2.1 Historie šlechtění

Až do konce 19. století bylo nejčastějším způsobem šlechtění zemědělských plodin pěstování náhodně vzniklých jedinců, kteří měli díky změnám v DNA odlišné kvalitativní znaky (Pečinka, 2020). V průběhu domestikace a adaptace různých druhů plodin pěstitelé nevědomky vytvářeli selekční tlak z důvodu poptávky. Během adaptace mechanismy přítomné u cibule podpořily selekci, která měla pozitivní výsledek na pěstování cibule v různých prostředích (Krishnamurthy a kol., 2011). Podle Pečinky (2020) je zásadní nevýhodou to, že v přírodních podmínkách je četnost změn DNA jen velmi malá a proto tyto způsoby šlechtění přestaly postupem času dostačovat.

Zlomový bod představovalo objevení dědičnosti a evoluce. Zejména významné byly objevy Johanna Gregora Mendela a jeho následovníků, které dokazovaly, že znaky, které se v potomcích první generace ztrácejí, se znovu objevují v dalších generacích. Tyto poznatky pak zásadně ovlivnily šlechtitelské postupy ve 20. století (Pečinka, 2020).

V první polovině 20. století se častokrát využívaly metody volného opylení rostlin. Proběhly experimenty, které porovnávaly různé metody opylování a šlechtění cibule kuchyňské z důvodu vyvinutí lepší odolnosti proti chorobám (Jones a Emsweller, 1933). Ve dvacátém století byl také objeven nový způsob šlechtění rostlin a to pomocí F_1 hybridů. Už v 60. letech 20. století tvořily F_1 hybridy cibule kuchyňské většinu z distribuovaných odrůd. Tyto rostliny jsou vhodné pro velkopěstitele, jelikož jejich výnosy jsou nadprůměrné. Zavedení těchto hybridů na trh bylo umožněno objevením samčí sterility, která se zakládá na cytoplazmatické neplodnosti pylu (Pekárková, 2005).

Mezi moderní způsoby šlechtění rostlin patří metody genového inženýrství. V genovém inženýrství se využívají změny v genetické informaci pomocí mutací, ale ty mohou v genomu vytvořit i nechtěné změny. Významnou roli pro analýzu genů hraje metoda sekvenování, díky níž lze identifikovat vhodné jedince pro šlechtění.

V posledním desetiletí dochází k rozvoji editace genomu pomocí tzv. CRISPR metody (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Tato metoda využívá systém s enzymem Cas9, který bakterie používají jako obranu proti virům.

Enzym Cas9 dokáže přestříhnout nukleovou kyselinu a řetězec spojit dohromady, čímž dojde k deaktivaci genu, nebo dokáže vložit nový řetězec a tím způsobit modifikaci rostlinného genomu. Tato metoda se začíná využívat i u editace genomu cibule kuchyňské, například pro editaci genu *PDS* (Pečinka, 2020; Mainkar a kol., 2023).

1.2.2 Molekulární markery ve šlechtění rostlin

Markery se v obecném základu rozdělují na klasické markery a DNA/molekulární markery. Mezi klasické markery patří morfologické, cytologické a biochemické markery. Příkladem molekulárních markerů je RFLP (fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (simple sequence repeats), SNP (single-nucleotide polymorphism) a DArT (diversity arrays technology). Existuje velké množství i jiných typů molekulárních markerů (Nadeema a kol., 2018).

Molekulární markery jsou sekvence nukleových kyselin nebo geny, u nichž je známa přesná pozice a umístění na chromozomu. Jsou úzce spjaty s cílovými geny (Nadeema a kol., 2018). Jsou polymorfní mezi jednotlivci nebo odrůdami. Lze je využít jako nástroje nejenom pro šlechtění cibule, ale i pro šlechtění jiných kulturních rostlin.

Výzkum molekulárních markerů začal v 80. letech díky objevu polymerázové řetězcové reakce (PCR). Díky tomu bylo možné prohloubit studium molekulárních markerů a genetických rozdílů rostlin, tvorby genetických map a také došlo k úspěšnému vývoji molekulárního šlechtění rostlin (Amiteye, 2021). Selekcce pomocí markerů (MAS) je šlechtitelský nástroj, kterým lze přesněji a úspěšněji selektovat v jednotlivých populacích. Díky selekci pomocí molekulárních markerů můžeme spojit určité dědičné vlastnosti se segmenty DNA, které zodpovídají za kontrolu dané vlastnosti (Datta a kol., 2011).

Významné usnadnění při identifikaci nových markerů představují metody genotypizace sekvenováním a mapování asociací. Tyto metody se často využívají pro hledání markerů pro rozsáhlé a složité genomy rostlin.

Molekulární markery rostlinných organismů lze uplatnit ve výzkumu heterózy, která určuje výkonnost potomstva (F_1) dvou zkřížených rodičů. Markery SSR byly použity pro zkoumání heterózy např. u rýže, pšenice, kukuřice a řepky. Dále lze markery použít pro identifikaci dihaploidů a genotypů izogenních linií a hybridů (markery SSR a SNP), vyhodnocování genetické diverzity (markery DArT a SNP),

QTL (Quantitative Trait Loci) mapování nebo selekce pomocí markerů. V případě cibule kuchyňské a jiných kulturních rostlin se molekulární markery hojně využívají pro detekci cytoplazmatické samčí sterility (CMS) a genů, které ji podmiňují (Nadeema a kol., 2018; Datta a kol. 2011).

1.3 Samčí sterilita

Vyhnánek (2019) uvádí, že samčí sterilita rostlin je jev, který způsobuje neschopnost rostliny vytvářet nebo uvolňovat funkční pylová zrna. Existuje několik typů samčí sterility u rostlin:

1. Jaderná samčí sterilita
2. Cytoplazmaticko-jaderná samčí sterilita
3. Cytoplazmatická samčí sterilita
4. Chemicky indukovaná samčí sterilita – indukována chemickými látkami
5. Transgenní samčí sterilita – geneticky modifikované rostliny

1.3.1 Jaderná samčí sterilita

Jaderná samčí sterilita bývá způsobena jedním recesivním jaderným genem. Tento typ sterility byl detekován u mnoha druhů rostlin (ječmen, rajče, bavlna aj.). U některých rostlin byla detekována jaderná samčí sterilita, která byla způsobena dominantním genem (světlice barvířská).

Samčí jaderná sterilita se využívá pro produkci hybridů. Sterilní rostlina (recesivní homozygot) se zkříží s heterozygotní fertlní rostlinou. Tím se vytvoří jak sterilní, tak i fertlní potomstvo (Vyhnánek, 2019; Agriinfo.in, 2016, online – <https://agriinfo.in/male-sterility-1752/>).

1.3.2 Cytoplazmatická/cytoplazmaticko-jaderná samčí sterilita (CMS)

Cytoplazmatická samčí sterilita bývá spojována s cytoplazmaticko-jadernou samčí sterilitou. Většinou se využívá pojem cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) pro oba tyto typy sterilit, protože se samotná cytoplazmatická sterilita bez vlivu jaderných genů objevuje pouze vzácně (Vyhnánek, 2019).

CMS je dědičný jev, při kterém nejsou rostliny schopny vytvářet životaschopná pylová zrna. Je to mateřsky děděná vlastnost. Tento jev byl zaznamenán u cca

140 druhů rostlin (např. cibule, čiroku, žita, slunečnice, mrkve, kukuřice aj.) (Kim, 2014; Kim a kol., 2015; Eckardt, 2006).

Sterilní rostliny cibule kuchyňské poprvé detekovali a popsali Jones a Emsweller v roce 1925. Konkrétně se jednalo o odrůdu Italian-Red. Rostliny neprodukovaly semena, ale vytvářely cibulky. Tyto cibulky se sklídily a použily pro další pěstování. Vypěstované rostliny se následně křížily (Pike, 1986).

CMS je u rostlin indukována mitochondriálními geny (lokus *Ms*). Mitochondriální genomy rostlin jsou výrazně rozsáhlejší oproti živočišným (Kim a Yoon, 2010). To znamená, že CMS je znak, který je přenášen pouze z mateřské rostliny na dceřiné potomstvo (González-Chavira a kol., 2023). Struktura mitochondriálních genů je složena z různých subgenomů. Sekvence, jejichž délka nepřekračuje 1000 bází, jsou často zprostředkovatelem dynamické přestavby mitochondriálního genomu. Právě geny vyvolávající CMS vznikají dynamickou přestavbou mitochondriálního genomu. Tyto geny jsou nazývány jako chimérické, protože jsou složeny ze známých sekvencí mitochondriálních genů a neznámých sekvencí. Nicméně mechanismus indukce CMS nebyl dosud vyřešen (Kim, 2014; Kim a kol., 2015).

CMS se objevuje u rostlin spontánně. To může být způsobeno díky širokému křížení, mutagenezi nebo mezidruhové výměně jaderných a cytoplazmatických genomů (Eckardt, 2006).

V minulosti byly pokusy chemicky indukovat cytoplazmatickou samčí sterilitu z důvodu ušetření času při hybridizaci. Chemická indukce CMS se prováděla u bavlny, rajčat, hledíku a cibule. Pro indukci se použil tributyl(2,4-dichlorobenzyl)phosphonium (Cohan a Weigle, 1966).

Samčí sterilita vyvolaná mitochondriálními geny může být potlačena jadernými geny pro obnovu fertility (geny *Rf*). Tyto geny kódují mimo jiné i proteiny s pentatrikopeptidovými repeticemi (PPR). Právě tyto geny by mohly vytvářet multiproteinové komplexy, které potlačují geny indukující CMS (Kim, 2014; Kim a kol., 2015). Díky tomuto jevu je možné studovat interakce mezi jadernými a mitochondriálními geny (Eckardt, 2006).

1.3.3 Typy CMS u cibule kuchyňské

V případě cibule kuchyňské existují tři typy cytoplazmy (tzv. mitotypy). Cytoplazma označována písmenem “N“ je fertální cytoplazma. Cytoplazmy označované písmeny “S“ a “T“ jsou sterilní cytoplazmy (Sharma a kol., 2023).

Typ CMS-S byl objeven jako první. Podrobně byl popsán ve 40. letech 20. století v práci od Jones a Clarke. Krátce nato Jones a Davis popsali využití CMS v produkci hybridních rostlin (González-Chavira a kol., 2023).

Typ CMS-T byl objeven díky výzkumu Berninger (1965) a následně byl popsán v práci Schweiguth (1973) (Manjunathagowda a kol., 2021).

Ferreira a kol. (2017) a Kim a Yoon (2010) na základě analýz mitochondriálního a chloroplastového genomu uvádí, že na indukci sterility samčího sterilního systému cibule se mohou podílet různé geny. Bylo zjištěno, že CMS-T cytoplazma není rozdílná od fertillní cytoplazmy, ale CMS-S cytoplazma se liší. To by mohlo znamenat, že CMS-T vzniká přímo z fertillní cytoplazmy.

System CMS-S je indukovan pomocí jednoho genu. Uvádělo se, že v systému CMS-T se pro obnovu sterility a fertility podílejí tři různé geny (González-Chavira a kol., 2023). Tuto myšlenku formuloval ve své práci Schweiguth (1973). To pak v roce 2014 rozporoval Kim, když detekoval lokus *Ms* u rostlin cibule kuchyňské, které měly cytoplazmatickou samčí sterilitu typu "T". Navrhl, že obnova fertility a sterility u rostlin s CMS-T může být způsobena stejným genem, jako u systému CMS-S nebo podobným genem.

Pro hybridizaci se nejčastěji využívají rostliny s typem sterility CMS-S a to hlavně díky jejich lepší stabilitě. Rostliny s typem sterility CMS-T lze pro hybridizaci využít také (hlavně Evropa), ale jejich použití je limitováno z důvodu složitějšího genetického dědění obnovy fertility (Manjunathagowda a kol., 2021).

1.3.4 Molekulární markery pro CMS u cibule kuchyňské

Molekulární markery se využívají ve šlechtění cibule kuchyňské pro zkrácení šlechtitelského cyklu a rychlého získání požadovaných genetických vlastností. Často se využívají markery, které jsou schopny rozlišit sterilní (typ "T" a "S") a fertillní cytoplazmy (typ "N"). Lokus *Ms* v genomu cibule způsobuje samčí sterilitu. Existuje několik markerů, které jsou úzce spojeny s tímto lokusem (Mahajan a Gupta, 2023).

Huo a kol. (2015) ve své studii vyvinuli pomocí alelové analýzy kodominantní marker založený na multiplexní PCR. Tento marker nazvali AcSKP1. Je v úplné vazebné nerovnováze s lokusem *Ms* u cibule. V jejich práci se jim také podařilo prokázat užitečnost markeru pro selekci a identifikaci genotypů lokusu *Ms*. Stejný marker byl využit i v práci od Ferreira a kol. (2017), avšak v této práci využili pro detekci lokusu *Ms* i marker AcPMS1 (Kim a kol. 2015).

Pro detekci cytoplazmatické samčí sterility (CMS) lze využít markery *cob* a *orfA501* (Sato, 1998; Engelke a kol., 2003). Marker *cob* byl identifikován pomocí specifických oligonukleotidů ze sekvence mitochondriálního genu *cob* (González-Chavira a kol., 2023; Sato, 1998). V cytoplazmě “S” marker *cob* rozlišuje polymorfismy mezi mitotypem “N” a “S”. Marker *orfA501* je založen na inzerci sekvence mitochondriálního genomu pažitky (González-Chavira a kol., 2023; Engelke a kol., 2003).

Tyto markery byly pro detekci CMS využity i v práci Ferreira a kol. (2017). Jak popisují ve své práci Engelke a kol. (2003), tak marker *orfA501* je schopen amplifikovat fragmenty o délce 473 bp v případě, že daná rostlina má cytoplazmatickou samčí sterilitu. V případě, že rostlina je fertilní, tak se fragmenty neamplifikují. Dále je popsáno v pracích Sato (1998) a Engelke a kol. (2003), že marker *cob* je schopen v systému CMS-S amplifikovat fragmenty o délce 180 a 414 bp. Naproti tomu rostliny se systémem CMS-T amplifikují fragmenty pouze o délce 180 bp a fragmenty s délkou 414 bp nejsou amplifikovány. Fertilní rostliny amplifikují pouze fragmenty o délce 180 bp. Pomocí těchto dvou markerů jsme schopni rozlišit rostliny, které jsou sterilní a které jsou fertilní. Následně je možné u sterilních rostlin rozlišit, zda se jedná o cytoplazmatickou samčí sterilitu typu “S” nebo o typ “T”.

Dalšími molekulárními markery, které lze využít pro produkci F₁ hybridů jsou *opt*, *jurnf05*, *orf725* a mnoho jiných. I tyto markery mají vazbu s lokusem *Ms* (Manjunathagowda a kol., 2021). Kim (2014) uvádí, že marker *jurnf05* by mohl být využit pro detekci *Rf* genu, který je obnovitelem fertility.

1.3.5 Využití CMS ve šlechtění cibule kuchyňské

I přesto, že je cibule kuchyňská jednou z nejvíce pěstovaných plodin na světě, dochází u jejích hlavních pěstitelů k poklesu produkce. To může být způsobeno tím, že je stále velká část produkované cibule pěstována z volně opylovaných odrůd namísto odrůd F₁ hybridních rostlin. Hybridizační problémy způsobené klasickým šlechtěním (např. dvouletý reprodukční cyklus, inbreeding, obtíže v udržování čistokrevných linií z důvodu vysokého křížení aj.) může vyřešit právě použití systému cytoplazmatické samčí sterility (CMS). F₁ hybridní odrůdy cibule mají výhodu díky heteróze (Manjunathagowda a kol., 2021). Heteróza (hetrózní efekt) hraje velký význam

ve zvýšení výnosů oproti volně opylovaným odrůdám a také v jednotnosti znaků významných pro zemědělskou produkci.

Díky tomuto postupu hybridizace lze přímo řídit produkci semen. Manuálně provádět kastraci (odstraňování prašníků) není praktické a výhodné, jelikož rostliny cibule kuchyňské obsahují velké množství květů. Z tohoto důvodu je z ekonomického a praktického hlediska lepší využívat systém CMS, protože sterilní rostliny se nemohou mezi sebou a ani samy opylovat. Díky tomu jsou produkovaná semena získána pomocí křížového opylení a my máme kontrolu nad produkcí semen (González-Chavira a kol., 2023).

Jako první navrhli využití CMS v F_1 hybridním šlechtění cibule Jones a Davis ve 40. letech 20. století. Tento typ šlechtění se využívá u cibule i u jiných zemědělských plodin (Kim, 2014; Kim a kol., 2015; Havey a Kim, 2021).

Pro vytvoření F_1 hybridů se používají tři typy linií. Jsou to mateřská linie se samčí sterilitou (CMS), linie udržující samčí sterilitu a opylující otcovské linie (Pekárková, 2005).

Pro vytvoření F_1 hybridů se v klasickém postupu nejprve musí izolovat sterilní rostliny cibule od fertálních. Pylovou sterilitu lze zkontrolovat pomocí 0,5% roztoku acetokarminu pod mikroskopem. Sterilní pylová zrna jsou oproti fertálním bezbarvá (Sharma a kol., 2023). Pylově sterilní kříženec se kříží s opylující otcovskou linií (Pekárková, 2005). Vzniklí potomci (F_1) se opět analyzují a rozdělují se na fertální a sterilní rostliny (pomocí 0,5% roztoku acetokarminu) a také na obnovitele sterility a fertility.

Klasický postup rozpoznání sterilních a fertálních rostlin lze usnadnit využitím molekulárních markerů, které celý postup urychlují. Vývoj nových markerů pro CMS, které lze používat při hybridizaci rostlin cibule (rozeznání fertálních a sterilních rostlin a následné rozeznání typů cytoplazmatické samčí sterility), je významnou součástí moderních šlechtitelských metod (Sharma a kol., 2023).

Pokud je jedinec z F_1 generace sterilní, tak to znamená, že je udržovatelem samčí sterility. Pokud je jedinec z F_1 generace fertální, tak to naopak znamená, že je udržovatelem fertility. Vytvoření linie s CMS trvá čtyři až osm let (Manjunathagowda a kol., 2021).

F_1 hybridní rostliny lze využívat i jako model pro studium interakce mezi jaderným a mitochondriálním genomem (Kim, 2014).

1.4 Izolace DNA

Extrakce nukleových kyselin je jednou ze základních metod molekulární biologie. Během této metody dochází k oddělení nukleových kyselin od ostatních součástí buněk. Existuje mnoho postupů jak nukleové kyseliny extrahovat, nicméně je důležité pomocí zvoleného postupu získat nukleovou kyselinu v co nejčistším nativním stavu a v dostatečném množství. Z těchto důvodů volíme postup extrakce na základě charakteru námi používaného vzorku (Šmarda, 2005).

Základní postup všech těchto metod extrakce nukleových kyselin zůstává stejný a spočívá v narušení buněčné stěny (pouze u rostlin), buněčné membrány a jaderné membrány za účelem uvolnění neporušené DNA do roztoku. Při tom jsou odstraněny kontaminující biomolekuly, jako jsou například proteiny, polysacharidy, lipidy, fenoly a další sekundární metabolity (Tiwari a kol., 2017). Pro rozrušení buněčných membrán se využívají detergenty. Podle typu izolace se používají detergenty SDS (dodecylsulfát sodný) a CTAB (cetyl trimethylamonium bromid) (Trojáněk, 2013).

Mezi nejčastěji prováděné postupy izolace DNA patří například fenol-chloroformová izolace, izolace pomocí komerčních kitů a magnetická izolace. Typy izolací vybíráme na základě izolovaného materiálu a podle následných analýz (Beran a kol., 2022).

1.4.1 Fenol-chloroformová izolace

Fenol-chloroformová izolace nukleových kyselin je velmi častá extrakční metoda. Během této extrakční metody dochází díky fenol-chloroformové směsi k denaturaci proteinů, které se vysrážejí. Fenol-chloroformová směs se nemísí s vodou a z tohoto důvodu se sraženina proteinů koncentruje do fázového rozhraní. Toho docílíme pomocí centrifugace. Po centrifugaci se těžší organická část nachází pod lehčí vodnou fází (Šmarda a kol., 2005).

1.4.2 Izolace pomocí komerčních kitů

Další častou metodou extrakce je využití komerčních kitů. Soupravy, které jsou specifické pro daný typ vzorku, obsahují potřebné pufry, spotřební plasty a protokoly, které lze využít (Beran a kol., 2022). Izolace DNA, které jsou prováděny pomocí nekomerčních protokolů jsou oproti komerčním kitům často více časově nákladné (Patzold a kol., 2020). Izolace pomocí kitů lze provést za méně než dvě hodiny i díky

tomu, že izolační postupy jsou k dispozici od dodavatele (Méndez-García a kol., 2018).

Princip této izolační metody začíná stejným způsobem jako jiné izolace DNA. Nejprve se provede lýze buněk a ke vzorku se přidá lyzační pufr. Následně se vzorek převede do jednorázových kolonek s křemičitou membránou. Tyto kolonky se centrifugují. Na membránu se naváže DNA a zbytek směsi proteče skrz membránu. Správného promytí docílíme několika opakováními promývání zachycené DNA. Nakonec se provádí eluce, kdy dochází ke konečnému promytí membrány. Díky tomu se čistá DNA dostane z membrány do nové sterilní mikrozkušavky. Médium využívané při této extrakci váže DNA, avšak proteiny nikoliv. Podstatnou výhodou této metody je, že se řadí mezi jedny z nejrychlejších izolačních metod, avšak zásadní nevýhodou je pořizovací cena komerčních kitů a jejich specifčnost (Beran a kol., 2022).

1.4.3 Magnetická izolace

Magnetická izolace nukleových kyselin využívá pro extrakci magnetické kuličky o průměru okolo 500 nm. Tyto magnetické nosiče jsou s imobilizovanými afinitními ligandy nebo jsou připravené z biopolymeru, který má afinitu k cílové nukleové kyselině. Z toho důvodu se na tyto magnetické kuličky naváží molekuly nukleových kyselin. Díky tomu lze nahromadit čistý vzorek DNA a zbytky nečistot ze vzorku odstranit. Tato technika se používá u automatizovaných postupů extrakce DNA nebo také u velkoobjemové purifikace (Martínez, 2023).

1.5 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Polymerázová řetězcová reakce (PCR), kterou vyvinul Kary B. Mullis v 80. letech 20. století, je metoda molekulární biologie, jejíž podstatnou výhodou je získání specifické sekvence genomové DNA (Šmarda a kol., 2005).

Je to metoda, která využívá enzymatickou amplifikaci DNA *in vitro* syntézou velkého množství kopií určité sekvence DNA (Pruša, 1997). Část sekvence nukleové kyseliny je ohraničena připojenými primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA. Následná syntéza nových vláken je zapříčiněna přítomností DNA-polymerázy a volnými nukleotidy. Pro PCR je nutné používat termostabilní polymerázy (např. *Taq* DNA-polymeráza). Tato polymeráza je schopna odolat teplotám, při nichž molekuly

DNA denaturují. Díky tomu může syntéza DNA probíhat v cyklech (Šmarda a kol., 2005).

Mezi základní fáze polymerázové řetězcové reakce patří: denaturace (teplota 94 – 95 °C), annealing (teplota 50 – 60 °C) a elongace (teplota této fáze se určuje podle použité DNA polymerázy; nejčastěji 72 °C). Tyto fáze se několikrát opakují (30 – 40 cyklů). Po 30 cyklech jsme schopni syntetizovat až 130 milionů nových vláken DNA (Brown, 2010; Trojánek, 2013).

1.6 Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza je separační technika, která je využívána k separaci nukleových kyselin a proteinů. Nabité molekuly nukleových kyselin mají schopnost se díky záporně nabitým fosfátovým skupinám přesouvat ve stejnosměrném elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Rychlost závisí na velikosti molekuly a silách, které na molekulu působí. Nejčastějšími typy elektroforézy jsou gelová elektroforéza, čipová elektroforéza a kapilární elektroforéza (Beran a kol., 2022).

V případě gelové elektroforézy jsou nejčastěji využívaným typem gelů agarózové gely (pro velké molekuly nukleových kyselin) a akrylamidové gely (pro menší molekuly nukleových kyselin). Před tím, než se začaly využívat agarózové gely se nukleové kyseliny dělily pomocí centrifugace v hustotním gradientu sacharózy (Šmarda, 2005, Lee a kol., 2012).

2 Cíle a hypotézy

Cílem práce bylo provést několik typů izolací DNA cibule kuchyňské z různých částí rostliny a zjistit, jaký vzorek je pro jaký typ izolace nejvhodnější a tím postup izolace optimalizovat. Následně se nejvhodnější typ izolace s nejvhodnějším typem vzorku použil pro izolaci DNA u vzorků rostlin, pro detekci lokusu *Ms* a pro detekci cytoplazmatické samčí sterility (CMS).

Polymerázové řetězcové reakce (PCR) zkušebních vzorků se provedly s použitím molekulárních markerů AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a AcPMS1 (Kim a kol., 2015) pro detekci lokusu *Ms* a markery *cob* (Sato, 1998), *orfA501* (Engelke a kol., 2003) a *orf725* (Kim a kol., 2009) pro detekci CMS.

Pomocí těchto markerů se provedla zkušební PCR a na základě výsledků se vybraly nejvhodnější markery pro detekci CMS a lokusu *Ms*. Tyto markery se použily pro PCR našich hlavních vzorků.

Hlavní vzorky byly tvořeny 6 liniemi rostlin (C1 – C6), z nichž se v následujících 16 týdnech odebíraly vzorky. Celkem bylo 96 vzorků. Časovou řadu různě starých vzorků jsme udělali z toho důvodu, aby se dokázalo, že detekce lokusu *Ms* a detekce CMS je možná u nejstarších vyklíčených rostlin, stejně jako u mladších rostlin.

Hypotéza byla taková, že starší rostliny mohou obsahovat kontaminující látky, které mohou inhibovat PCR, což ztíží detekci lokusu *Ms* a detekci CMS.

3 Materiál a metody

3.1 Optimalizace metod extrakce DNA

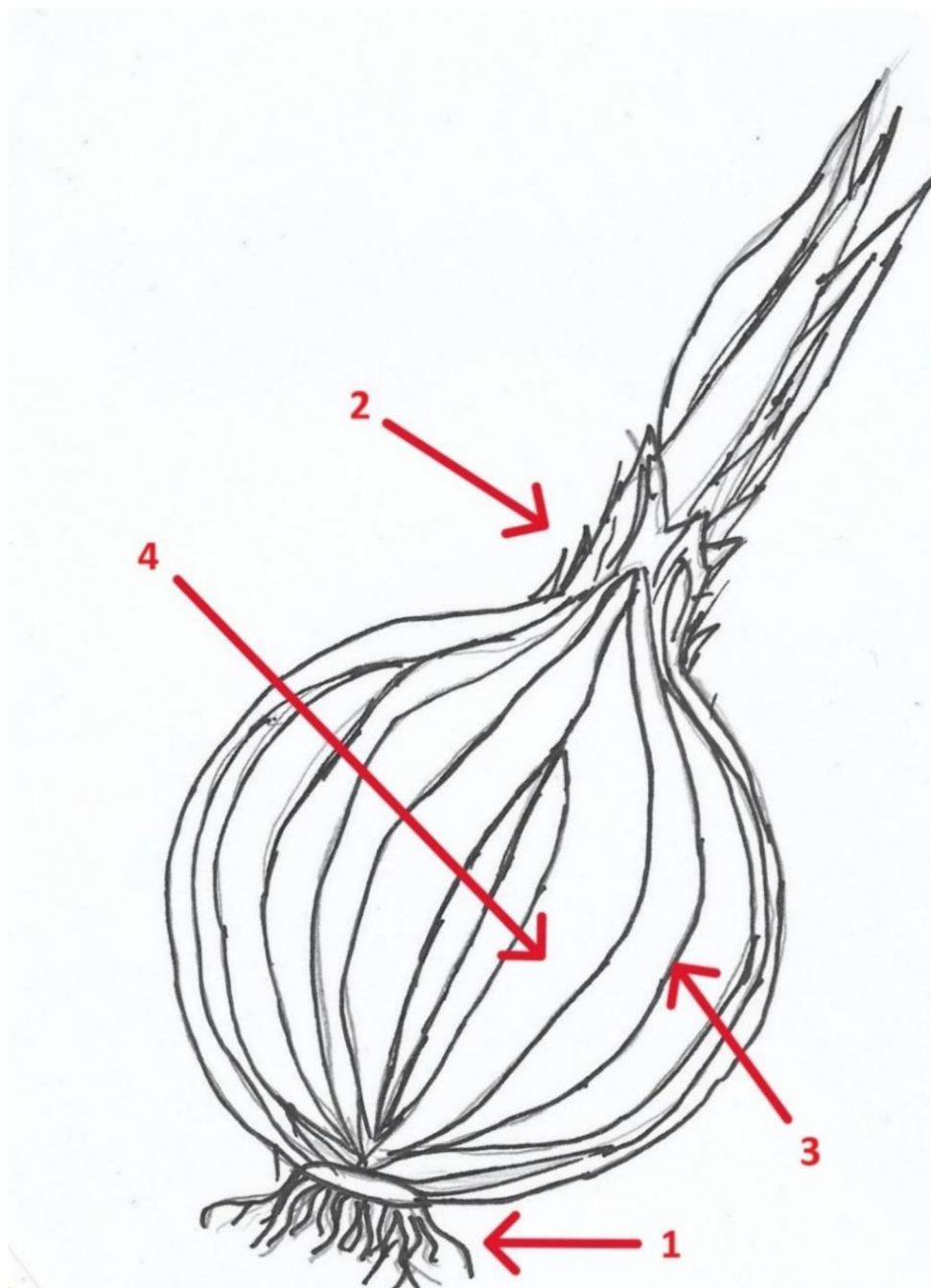
Prvním úkonem provedeným v rámci praktické části této práce byla optimalizace metod extrakce DNA. Cílem praktické části práce bylo zjistit, která část z rostliny cibule kuchyňské bude nejvíce vyhovujícím pro izolaci rostlinné DNA a také jaká metoda extrakce nukleových kyselin bude vykazovat nejlepší výsledky. Bylo nutné, aby izolovaná DNA měla co největší čistotu bez příměsí nežádoucích látek, aby bylo dostatečné množství izolovaného roztoku s DNA a aby byla DNA v dostatečné koncentraci.

3.1.1 Rostlinný materiál

Jakožto materiál, ze kterého byla DNA izolována byly vybrány různé části rostliny cibule kuchyňské (viz. Tabulka 3.1 a Obrázek 3.1) z nichž některé byly odebrány v různém časovém horizontu.

Tabulka 3.1: Typy vzorků pro extrakci DNA

Typ vzorku	Číslo popisku na obrázku 2.1
Kořínky	1
Suchá slupka	2
Blanka suknice cibule	3
Suknice cibule	4
Vyrašené listy	
Listy v různé fázi růstu	



Obrázek 3.1: Části cibule využité pro izolaci DNA

Vzorky, u kterých byly pro izolaci DNA využity kořinky, suchá slupka, blanka suknice cibule, suknice a vyrašené listy (tj. vzorky 1 – 8), byly odebrány již ze sklizených cibulí. Vzorky, u nichž byly pro izolaci DNA použity malé rostliny a listy v různé fázi růstu (tj. 9 – 12), byly vypěstovány samostatně ve výsevním substrátu smíchaném s perlitem.

Tabulka 3.2: Přehled vzorků určených pro izolaci DNA

Číslo vzorku	Linie	Typ vzorku
1	ST A I	Suchá slupka
2	ST A I	Kořínky
3	ST A I	Suknice
4	ST A I	Blanka suknice cibule
5	A II TKR F1	Suchá slupka
6	A II TKR F1	Suknice
7	B II × KAT F1	Vyrašené listy
8	B II × KAT F1	Kořínky
9	A II TKR F1	Listy (stáří 3 týdny)
10	ST A I	Listy (stáří 1,5 týdne)
11	A II TKR F1	Listy (stáří 5 týdnů)
12	ST A I	Listy (stáří 3,5 týdne)

Pro jednotlivé vzorky byly použity metody extrakce DNA pomocí komerčních kitů DNeasy Plant Pro a Plant Kits (Qiagen, Německo), pomocí modifikované metody CTAB-PVP (Doyle, 1991) a pomocí izolačního robota MagCore (RBC Bioscience, Taiwan). Jednotlivé metody byly vyhodnoceny a výsledky mezi sebou porovnány v kapitole 4 Výsledky.

3.1.2 Extrakce DNA pomocí kitu

Pro izolaci DNA pomocí komerčních kitů jsme použili kity DNeasy Plant Pro a Plant Kits (Qiagen, Německo). Kity obsahují všechny potřebné pufrы, protokoly a spotřební plasty. Pro izolaci se využívají kolonky s křemíkovými membránami, které zachytávají DNA. Princip této metody byl popsán v kapitole 1.4.2 Izolace pomocí komerčních kitů.

3.1.3 Extrakce DNA pomocí metody CTAB-PVP

V případě izolace DNA pomocí CTAB-PVP byla využita metoda extrakce s chloroformem:IAA (24:1). Postup izolace DNA byl převzat z publikace Doyle (1991) a námi upraven pro naše účely. Následující postup izolace je přepočítaný na jeden vzorek.

1. Nejprve se zahřeje lyzační pufr 2× PVP-CTAB na 65 °C.
2. Rostlinné pletivo, ze kterého se bude DNA extrahovat, se rozdrtí v 1,5ml sterilní mikrocentrifugační zkumavce pomocí homogenizátoru.
3. K rozdrčenému pletivu se přidá 495 µl předehřátého 2×PVP-CTAB a 5 µl merkptoethanolu. Tento krok se provádí v digestoři z důvodu nebezpečnosti použitých látek.
4. Nechá se 45 minut inkubovat při teplotě 65 °C a průběžně se promíchává.
5. Po inkubaci se přidá do vzorku 500 µl chloroformu:IAA (24:1). Tento krok opět se provádí v digestoři.
6. Směs se promíchává 10 minut a pak se centrifuguje pět minut při 12000 otáčkách za minutu.
7. Připraví se nová 1,5ml mikrocentrifugační zkumavka. Do této zkumavky se odpipetuje vodná fáze.
8. Přidá $\frac{1}{5}$ objemu (v našem případě cca 80 µl) 5% CTAB a směs se promíchá.

-
9. Přidá 500 µl chloroformu:IAA (24:1) a 10 minut nechává promíchávat. Tento krok se také provádí v digestoři.
 10. Po promíchání se vzorek centrifuguje 5 minut při 13000 otáčkách za minutu.
 11. Opět se připraví nová 1,5ml mikrocentrifugační zkumavka a odpipetuje se vodná fáze.
 12. Přidá se $\frac{2}{3}$ objemu (cca 250 µl) ledového isopropanolu a třikrát se lehce promíchá. Tento vzorek se vloží na noc do mrazáku při -20 °C.
 13. Druhý den se vzorek centrifuguje 5 minut při 4 °C při 13000 otáčkách za minutu. DNA se zachytí na dně zkumavky. Opatrně se odlije supernatant.
 14. Přidá se 300 µl 1× TE pufru a inkubuje se 60 minut při 37 °C.
 15. Přidá se 600 µl ledového 96% ethanolu a třikrát se lehce promíchá.
 16. Vzorek se vloží do mrazáku při -20 °C na cca 30 minut (maximálně na 12 hodin).
 17. Po uplynutí doby se vyndá vzorek z mrazáku a 10 minut se centrifuguje při 4 °C při 13000 otáčkách za minutu. DNA se zachytí na dně zkumavky. Opatrně se odlije supernatant.
 18. Přidá se 1 ml ledového 70% ethanolu a třikrát se lehce promíchá. Pak se centrifuguje 2 minuty při 4 °C při 13000 otáčkách za minutu. Odstraní se supernatant.
 19. Pro docílení maximální čistoty extrahované DNA se opakuje krok č. 18 ještě jednou.
 20. Po promývání se zkumavka s usazenou DNA vysušuje. Může se použít termoblok zahřátý na 37 °C.
 21. Po vysušení se přidá 50 µl 1× TE pufru a DNA se 40 minut uvolňuje při teplotě 37 °C. Izolovaná DNA se smísí s TE pufrem, který udržuje stabilitu roztoku a DNA lze takto po určitou dobu skladovat.

3.1.4 Extrakce DNA pomocí izolačního robota MagCore

Pro tuto extrakci DNA se využil izolační robot MagCore (RBC Bioscience, Taiwan). V robotovi byly použity zkumavky a chemikálie obsažené v kitu Plant kit 301, který je určen pro robota MagCore. Metoda využitá v případě této extrakce DNA byla izolace

pomocí magnetických kuliček. Princip této izolace DNA byl popsán v kapitole 1.4.3 Magnetická izolace.

3.2 Optimalizace PCR zkušebních vzorků

Cílem optimalizace polymerázové řetězcové reakce (PCR) bylo detekovat CMS a lokus *Ms*. Nejprve se provedla zkušební PCR za použití několika různých markerů. Produkty těchto PCR se vyhodnotily a následně se rozhodlo, které markery se použijí pro PCR analýzu hlavních vzorků.

Použitými molekulárními markery byly markery AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a AcPMS1 (Kim a kol., 2015) pro detekci lokusu *Ms* a markery *cob* (Sato, 1998), *orfA501* (Engelke a kol., 2003) a *orf725* (Kim s kol., 2009) pro detekci CMS. Rostlinný materiál, který se použil pro PCR zkušebních vzorků byly vzorky listů, které se použily pro optimalizaci izolace DNA metodou CTAB-PVP v předešlé podkapitole (viz. Tabulka 3.2).

3.2.1 Detekce lokusu *Ms* u zkušebních vzorků

U extrahované DNA ze zkušebních vzorků byla provedena polymerázová řetězcová reakce (PCR). Cílem bylo optimalizovat metodu PCR, tak aby bylo možné detekovat lokus *Ms*. Pro tuto PCR analýzu byly použity markery AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a AcPMS1 (Kim a kol., 2015).

Primery použité pro marker AcSKP1 byly FU 898, FD 898, SU 628 a SD 628 (Huo a kol., 2015). Primery, které se použily pro marker AcPMS1 byly Forward a Reverse (Kim a kol., 2015). Sekvence jednotlivých primerů jsou obsaženy v Tabulce 3.4.

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker AcSKP1 (Huo a kol., 2015) obsahovala následující komponenty (přepočteno na 1 vzorek):

1. 10 µl MasterMix (TopBio)
2. 0,4 µl primer FU 898
3. 0,4 µl primer FD 898
4. 0,4 µl primer SU 628
5. 0,4 µl primer SD 628
6. 7,4 µl H₂O
7. 1 µl DNA

Celkové množství reakční směsi pro 1 vzorek bylo 20 μ l.

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker AcPMS1 (Kim a kol., 2015) obsahovala následující komponenty (přepočteno na 1 vzorek):

1. 10 μ l MasterMix (TopBio)
2. 0,4 μ l primer reverse
3. 0,4 μ l primer forward
4. 8,2 μ l H₂O
5. 1 μ l DNA

Celkové množství reakční směsi pro 1 vzorek bylo 20 μ l.

PCR pro marker AcSKP1 (Huo a kol., 2015) provedená v termocycleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) měla následující teplotní profil:

1. 94 °C 4 minuty
 2. 94 °C 30 sekund
 3. 58 °C 45 sekund
 4. 72 °C 1 minuta
 5. 72 °C 5 minut
 6. 4 °C ∞ minut
- 35 cyklů

PCR pro marker AcPMS1 (Kim a kol., 2015) provedená v termocycleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) měla následující teplotní profil:

1. 95 °C 4 min
 2. 95 °C 30 s
 3. 65 °C 30 s
 4. 72 °C 1 min
 5. 95 °C 30 s
 6. 57 °C 30 s
 7. 72 °C 1 min
 8. 72 °C 10 min
 9. 4 °C ∞ minut
- 10 cyklů (-0,8 °C)
- 35 cyklů

Po provedení polymerázové řetězové reakce se provedla gelová elektroforéza pro vizualizaci výsledků. Její postup byl stejný jako v podkapitole 3.4 Gelová elektroforéza. Pak se vyhodnotily oba markery mezi sebou. Následně se rozhodlo, který z markerů je vhodnější pro použití pro PCR hlavních vzorků.

3.2.2 Detekce CMS u zkušebních vzorků

Pro detekci CMS u zkušebních vzorků byla použita PCR metoda, která umožnila identifikaci sterilních a fertálních jedinců v linii. Pro tuto identifikaci se využily markery *cob* (Sato, 1998), *orfA501* (Engelke a kol., 2003) a *orf725* (Kim a kol., 2009). Markery *cob* a *orfA501* se vyhodnocují společně. Marker *orf725* se vyhodnocuje samostatně.

U markeru *cob* byly použity tři primery a to *cob S*, *cob N* a *cob common* (Sato, 1998). U markeru *orfA501* byly použity dva primery a to *orfA501.1* a *orfA501.2* (Engelke a kol., 2003). U markeru *orf725* byly použity primery MK-F, MK-R1 a MK-R2 (Kim a kol., 2009).

Primery pro marker *cob* by měly amplifikovat fragmenty o délce 180 a 414 bp. Primery pro marker *orfA501* by měly amplifikovat fragmenty o délce 473 bp. Primery použité pro marker *orf725* by měly amplifikovat fragmenty o délce 628 bp a 833 bp. Všechny použité primery jsou obsaženy v tabulce 3.4.

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker *cob* obsahovala následující komponenty (přepočteno na 1 vzorek):

1. 12,5 µl MasterMix (TopBio)
2. 0,5 µl primer *cob N*
3. 0,5 µl primer *cob S*
4. 0,5 µl primer *cob common*
5. 10 µl H₂O
6. 1 µl DNA

Celkové množství reakční směsi pro 1 vzorek bylo 25 µl.

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker *orfA501* obsahovala následující komponenty (přepočteno na 1 vzorek):

1. 12,5 µl MasterMix (TopBio)
2. 0,5 µl *orfA501.1*
3. 0,5 µl *orfA501.2*
4. 10,5 µl H₂O
5. 1 µl DNA

Celkové množství reakční směsi pro 1 vzorek bylo 25 µl.

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker *orf725* obsahovala následující komponenty (přepočteno na 1 vzorek):

-
1. 12,5 μl MasterMix (TopBio)
 2. 0,5 μl primer MK-F
 3. 0,5 μl primer MK-R1
 4. 0,5 μl primer MK-R2
 5. 10 μl H₂O
 6. 1 μl DNA

Celkové množství reakční směsi pro 1 vzorek bylo 25 μl .

PCR analýza pro marker *cob* provedená v termocyleru Biometra TProfessional

Gradient (Analytik Jena, Německo) měla následující teplotní profil:

- | | | | | |
|----|-------|----------------|---|----------|
| 1. | 94 °C | 2 minuty | } | 36 cyklů |
| 2. | 94 °C | 30 sekund | | |
| 3. | 52 °C | 1 minuta | | |
| 4. | 72 °C | 2 minuty | | |
| 5. | 72 °C | 5 minut | | |
| 6. | 4 °C | ∞ minut | | |

PCR analýza pro marker *orfA501* provedená v termocyleru Biometra

TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) měla následující teplotní profil:

- | | | | | |
|----|-------|----------------|---|----------|
| 1. | 94 °C | 2 minuty | } | 35 cyklů |
| 2. | 94 °C | 30 sekund | | |
| 3. | 54 °C | 1 minuta | | |
| 4. | 72 °C | 2 minuty | | |
| 5. | 72 °C | 5 minut | | |
| 6. | 4 °C | ∞ minut | | |

PCR analýza pro marker *orf725* provedená v termocyleru Biometra

TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) měla následující teplotní profil:

- | | | | | |
|----|-------|----------------|---|----------|
| 1. | 94 °C | 5 min | } | 40 cyklů |
| 2. | 94 °C | 30 s | | |
| 3. | 60 °C | 1 min | | |
| 4. | 72 °C | 1,5 min | | |
| 5. | 72 °C | 5 min | | |
| 6. | 4 °C | ∞ minut | | |

Po provedení polymerázové řetězcové reakce se provedla gelová elektroforéza pro vizualizaci výsledků. Její postup byl stejný jako v podkapitole 3.4 Gelová

elektroforéza. Pak se vyhodnotily všechny markery mezi sebou. Následně se rozhodlo, které markery jsou vhodnější pro naše použití pro hlavní vzorky.

3.3 PCR hlavních vzorků

3.3.1 Rostlinný materiál hlavních vzorků

V polymerázové řetězové reakci pro detekci cytoplazmatické samčí sterility (CMS) a lokusu *Ms* se použily nově vypěstované rostliny ze šesti linií cibule kuchyňské. Z každé ze šesti linií se vyselo pět semen do substrátu s perlitem. Tato semena pocházejí od firmy MORAVOSEED CZ a.s.. Linie semen, které se použily pro optimalizaci PCR byly následující:

1. Linie A I sterilní (označení C1)
2. Linie B II fertilní (označení C2)
3. Linie A II fertilní (označení C3)
4. Linie B I sterilní (označení C4)
5. Linie B II fertilní (označení C5)
6. Linie A II fertilní (označení C6)

Linie označená C5 byla stejná jako linie označená C2, pouze s tím rozdílem, že semena linie C5 byla sklizena v roce 2020 a semena linie C2 byla sklizena v roce 2021. Linie označená C6 byla stejná jako linie označená C3, ale opět s rozdílem roku sběru semen. Semena linie C6 byla sklizena v roce 2019 a semena linie C3 byla sklizena v roce 2021. Rostliny všech těchto linií byly pěstovány ve směsi substrátu a perlitu (viz. Obrázek 3.2).



Obrázek 3.2: Pěstování rostlin cibule kuchyňské

Po dobu 16 týdnů od vytvoření listů byly z náhodných rostlin každé linie odebírány do mikrozkupek cca 1cm části listů (tj. 16 vzorků ke každé z linií C1 až C6, tedy celkem 96 vzorků). Listy jako vzorky byly vybrány z důvodu snadného a postupného odběru a také z důvodu snazší homogenizace během extrakce DNA. Každý jednotlivý týden byl označen písmenem podle abecedy (viz. Tabulka 3.3). Tyto vzorky byly uchovávány v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla u těchto vzorků provedena izolace DNA pomocí metody CTAB-PVP, z důvodu nejlepších výsledků této metody. Postup extrakce byl stejný jako u předešlé izolace pomocí detergentu CTAB-PVP.

Tabulka 3.3: Seznam vzorků pro optimalizaci PCR

Týden	Vzorek					
1.	C1A	C2A	C3A	C4A	C5A	C6A
2.	C1B	C2B	C3B	C4B	C5B	C6B

3.	C1C	C2C	C3C	C4C	C5C	C6C
4.	C1D	C2D	C3D	C4D	C5D	C6D
5.	C1E	C2E	C3E	C4E	C5E	C6E
6.	C1F	C2F	C3F	C4F	C5F	C6F
7.	C1G	C2G	C3G	C4G	C5G	C6G
8.	C1H	C2H	C3H	C4H	C5H	C6H
9.	C1I	C2I	C3I	C4I	C5I	C6I
10.	C1J	C2J	C3J	C4J	C5J	C6J
11.	C1K	C2K	C3K	C4K	C5K	C6K
12.	C1L	C2L	C3L	C4L	C5L	C6L
13.	C1M	C2M	C3M	C4M	C5M	C6M
14.	C1N	C2N	C3N	C4N	C5N	C6N
15.	C1O	C2O	C3O	C4O	C5O	C6O
16.	C1P	C2P	C3P	C4P	C5P	C6P

3.3.2 Detekce lokusu *Ms* u hlavních vzorků

U extrahovaných vzorků DNA byla provedena polymerázová řetězcová reakce (PCR). Cílem bylo optimalizovat metodu PCR, tak aby bylo možné detekovat lokus *Ms*. K tomu byl využit kodominantní marker AcSKP1 (Huo a kol., 2015). Pro tento marker byly použity primery FU 898, FD 898, SU 628 a SD 628 (Huo a kol., 2015). Sekvence jednotlivých primerů jsou obsaženy v tabulce 3.4.

Reakční směs použitá v PCR pro marker AcSKP1 byla stejná jako u zkušebních vzorků v předešlé podkapitole.

Celkové množství reakční směsi pro jeden vzorek bylo 20 μ l. Vzorků bylo celkově 96, ovšem PCR se prováděla postupně se 16 vzorky a s jednou negativní kontrolou bez obsahu DNA.

Teplotní profil PCR pro marker AcSKP1 provedený v termocyleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) byl stejný jako v předchozí podkapitole.

Po provedení polymerázové řetězcové reakce se provedla gelová elektroforéza pro vizualizaci výsledků.

3.3.3 Detekce CMS u hlavních vzorků

Pro detekci CMS byla použita PCR metoda, která umožnila identifikaci sterilních a fertálních jedinců v linii. Pro tuto identifikaci se využily markery *cob* a *orfA501* (Sato, 1998; Engelke a kol., 2003). U markeru *cob* byly použity tři primery a to *cob S*, *cob N* a *cob common* (Sato, 1998). U markeru *orfA501* byly použity dva primery a to *orfA501.1* a *orfA501.2* (Engelke a kol., 2003). Primery pro marker *cob* amplifikují fragmenty o délce 180 a 414 bp. Primery pro marker *orfA501* amplifikují fragmenty o délce 473 bp. Použité primery jsou obsaženy v tabulce 3.4.

Díky těmto primerům lze identifikovat i typ cytoplazmatické samčí sterility (CMS-S a CMS-T).

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker *cob* byla stejná jako v předchozí podkapitole se zkušebními vzorky.

Reakční směs použitá v PCR analýze pro marker *orfA501* byla také stejná jako v předchozí podkapitole se zkušebními vzorky.

Celkové množství reakční směsi pro jeden vzorek bylo 25 µl. Obě PCR analýzy byly provedeny u všech vzorků podle jednotlivých týdnů (A až P). Celkově byla provedena PCR u 96 vzorků pro marker *cob* a u 96 vzorků pro marker *orfA501*, ovšem PCR se také prováděla postupně se 16 vzorky a s jednou negativní kontrolou bez obsahu DNA.

Teplotní profil PCR pro marker *cob* provedený v termocyleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) měl stejný postup jako v předchozí podkapitole se zkušebními vzorky.

Teplotní profil PCR pro marker *orfA501* provedený v termocyleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) měl také stejný postup jako v předchozí podkapitole se zkušebními vzorky.

Po provedení polymerázové řetězcové reakce se provedla gelová elektroforéza pro vizualizaci výsledků.

Tabulka 3.4: Použité primery pro PCR

Primery pro detekci lokusu <i>Ms</i> – markery AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a AcPMS1 (Kim a kol., 2015)	
Označení primeru	Sekvence
FU 898	5'-GCAATACACAGCTTCTAGCTGAATT-3'
FD 898	5'-AACACACACACAGAGTGAGAAATTTTATAT-3'
SU 628	5'-TCTGTGTGTGTGTGTAATTTCTCTG-3'
SD 628	5'-CGGAAGATTAATATTTTGC GTATA CAT-3'
Forward	5'-GGTCACCAGGTGGAGAGAGAA-3'
Reverse	5'-TCATTGAGCTGCATCCAAAA-3'
Primery pro detekci CMS – markery <i>cob</i> (Sato, 1998), <i>orfA501</i> (Engelke a kol., 2003) a <i>orf725</i> (Kim a kol., 2009)	
Označení primeru	Sekvence
<i>cob</i> S	5'-GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT-3'
<i>cob</i> N	5'-TCTAGATGTCGCATCAGTGGAATCC-3'
<i>cob</i> common	5'-CTTTTCTATGGTGACA ACTCTCTT-3'
<i>orfA501.1</i>	5'-ATGGCTCGCCTTGAAAGAGAGC-3'
<i>orfA501.2</i>	5'-CCAAGCATTTGGCGCTGAC-3'
MK-F	5'-CATAGGCGGGCTCACAGGAATA-3'
MK-R1	5'-AATCCTAGTGTCCGGGGTTTCT-3'
MK-R2	5'-CAGCGAACTTTCATTCTTTCGC-3'

3.4 Gelová elektroforéza

Cílem gelové elektroforézy byla vizualizace výsledků amplifikace produktů provedené polymerázové řetězcové reakce pomocí UV záření na agarózovém gelu. Princip elektroforézy byl vysvětlen v kapitole 1.6 Elektroforéza nukleových kyselin.

Nejprve byla připravena nalévací vana s hřebínky správné velikosti, tak aby se v gelu vytvořil dostatečný počet jamek. Následně se připravil 1,5% gel (1,5 g agarózy do 100 ml pufru) pro elektroforézu pro detekci lokusu *Ms*. Pro elektroforézu pro detekci CMS byl připraven 2% gel (4 g agarózy do 200 ml pufru). Gel se připravil pomocí práškové agarózy a TBE pufru (Tris-borátový pufr). Agaróza se přesypala z váženky do Erlenmayerovy baňky. Do baňky se pak přilil TBE pufru. Směs se

zamíchala, dala se do mikrovlnné trouby a zahřívala dokud se agaróza v pufru nerozpustila.

Po rozpuštění agarózy se tekutý gel zchladil pod tekoucí vodou na cca 60 °C a následně se do gelu přidalo 5 µl ethidium bromid pro detekci lokusu *Ms* a 10 µl do gelu pro detekci CMS. Směs se řádně zamíchala a nalila se do připravené nalévací vany s hřebínky, které v gelu vytvořily malé jamky. Odstranily se viditelné bubliny a gel se nechal ztuhnout.

Po ztuhnutí gelu se opatrně vytáhly hřebínky, tak aby se gel nepoškodil. Nalévací vana s gelem se ponořila do elektroforetické vany, ve které byl TBE pufr. Gel musí být úplně ponořen.

Poté se do jamek gelu napipetovalo 16 produktů PCR jedné linie, negativní kontrola a dva velikostní markery (100 bp) na jeden řádek (na konec a na začátek řádku). Množství tekutiny napipetované do jedné jamky bylo 10 µl.

Po napipetování se elektroforetická vana uzavřela a kabely se připojily ke zdroji elektrického napětí. Napětí na zdroji se nastavilo na 100 V v případě elektroforézy pro detekci lokusu *Ms* a 110 V v případě elektroforézy pro detekci CMS. Elektroforéza se spustila na dobu 45 minut.

Po uplynutí 45 minut se elektroforéza zastavila, gel se vyjmul z elektroforetické vany a pomocí UV záření se zobrazily výsledky.

Tento postup se opakoval u všech produktů PCR podle jednotlivých linií.

4 Výsledky

4.1 Výsledky optimalizace metod extrakce DNA

Z výsledků izolace DNA je patrné, že nejlepších výsledků dosáhla izolace DNA pomocí CTAB-PVP. Čistota je podle měření na spektrofotometru pro nano objemy výrazně lepší než u ostatních metod extrakce DNA. Hodnoty koncentrace DNA jsou ve vzorcích izolovaných pomocí CTAB-PVP taktéž lepší než u ostatních metod extrakce (viz. tabulky 4.1 a 4.2).

Nukleové kyseliny mají absorbanční maximum 260 nm. Poměr 260 nm a 280 nm nám určuje míru čistoty extrahované DNA. Tato hodnota by se měla pohybovat okolo hodnoty 1,8 – 2,2. Absorbance 230 nm je absorbance jiné kontaminace (např. lipidy, proteiny, sacharidy...). Poměr 260 nm a 230 nm by se měl pohybovat okolo hodnoty 2,0 – 2,2 (Datta a kol., 2011).

Dalším důležitým výsledkem je, že kvalita extrahované DNA pomocí CTAB-PVP u postupně odebíraných vzorků listů rostlin, se mezi sebou neliší. Nejmladší listy (1,5 týdne) mají podobné výsledky, jako listy nejstarší (5 týdnů). U vzorků, které se izolovaly pro provedení PCR byla vyextrahovaná DNA stejně kvalitní. I nejstarší vzorky (16 týdnů) poskytly dostatečně kvalitní DNA. To znamená, že stáří odebraného listu nehraje roli v kvalitě izolátu DNA.

Izolace DNA pomocí komerčních kitů byla z hlediska pracnosti jednoznačně snazší než izolace DNA pomocí CTAB-PVP. Na druhou stranu je důležité zmínit, že izolační kity jsou výrazně dražší, což zvyšuje náklady na izolaci. Naproti tomu izolace pomocí CTAB-PVP je levnější a tudíž cena na jeden vzorek je nižší.

Výhodou izolačních kitů je to, že existuje velké množství typů kitů, které si lze vybrat pro daný typ a charakter vzorku, u kterého izolujeme DNA. Součástí kitu byl i protokol, který obsahoval přesný postup izolace.

U izolace CTAB-PVP je nutné si připravit vlastní protokol a postup izolace a podle potřeby ho i upravovat. V našem případě jsme už napoprvé získali kvalitní výsledky a nebylo nutné náš postup dále měnit a upravovat.

Izolace DNA pomocí izolačního robota byl nejsnazší způsob extrakce DNA, ale pořizovací cena robota je výrazně vyšší než pomůcky pro izolaci pomocí CTAB-PVP nebo komerčních kitů. Navíc je potřeba vlastnit i kity, které robot použije pro vlastní izolaci, což ještě více zvyšuje náklady.

Tabulka 4.1: Výsledky izolace DNA pomocí MagCore a CTAB-PVP

	MagCore			CTAB-PVP		
Vzorek	c (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230	c (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	-7,37	0,93	1,11	8,91	2,59	-4,42
2	-5,35	0,73	1,12	38,90	2,17	2,61
3	-3,52	0,54	0,68	127,13	2,17	1,94
4	-5,84	0,86	0,86	28,14	2,64	1,47
5	-5,51	0,83	0,80	19,44	2,39	1,96
6	1,65	-0,53	-0,56	114,33	2,11	2,25
7	16,15	3,54	4,96	252,14	2,16	2,29
8				21,77	2,52	11,71
9	8,37	-25,74	15,30	393,41	2,17	2,42
10				149,09	2,18	2,38
11	32,15	2,42	3,30	767,79	2,17	2,39
12	3,21	-0,84	-2,50	369,66	2,13	2,37

Tabulka 4.2: Výsledky izolace DNA pomocí kitů

	DNeasy Plant Pro			DNeasy Plant Kit		
Vzorek	c (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230	c (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	2,39	2,00	0,42	4,41	1,50	0,70
2	14,96	1,77	1,09			
3	18,06	1,82	1,44	14,35	1,72	0,97

4	16,73	2,19	1,13	3,96	1,88	0,22
5	18,32	2,56	0,93	5,41	1,77	0,54
6	29,40	2,02	1,17	4,83	1,80	0,70
7	72,19	1,87	1,99	26,87	1,76	1,07
8	52,77	1,86	1,48			
9	6,37	0,77	-0,5	69,44	1,87	2,06
10	25,70	1,97	1,23	35,35	1,98	1,33
11	36,83	2,93	0,81	85,16	1,91	1,90
12	9,11	1,86	1,14	41,84	1,85	1,64

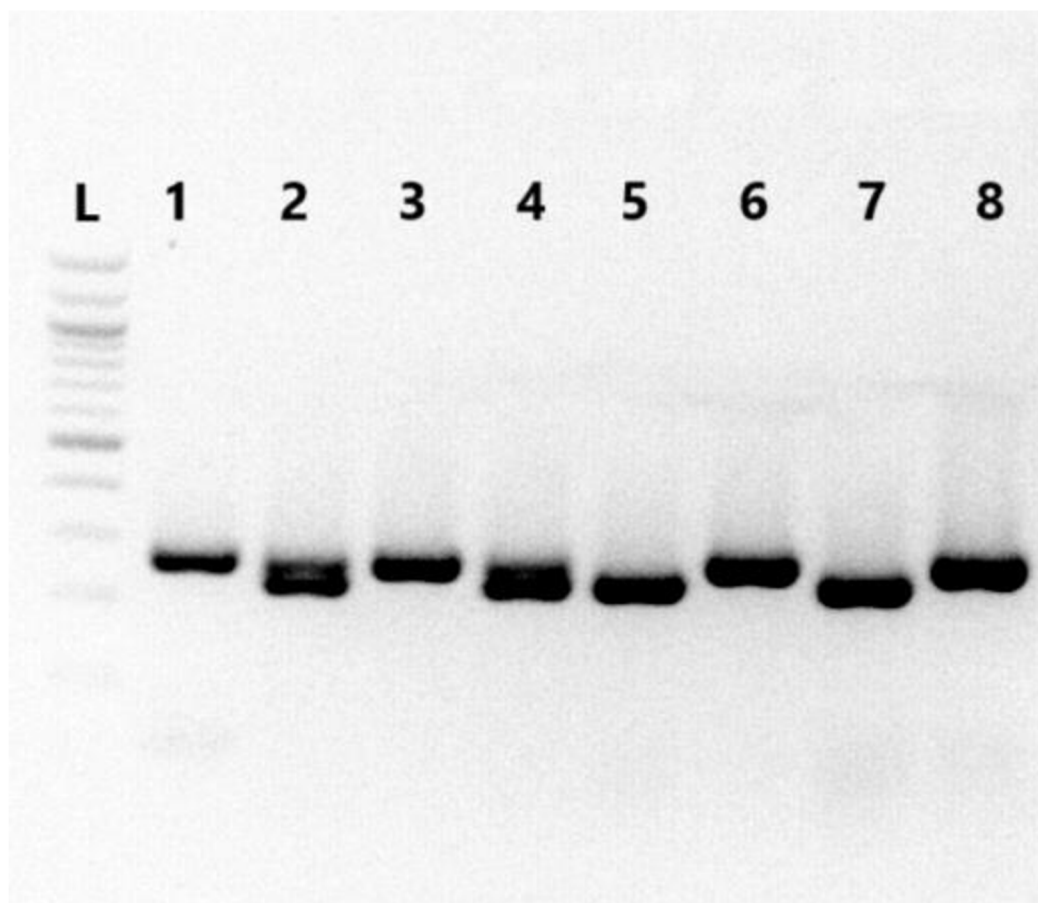
4.2 Výsledky optimalizace PCR u zkušebních vzorků

4.2.1 Výsledky detekce lokusu *Ms* u zkušebních vzorků

Po provedené elektroforéze se agarózové gely podsvítily UV světlem. Následně byly vyfotografovány a vyhodnoceny. Pro detekci lokusu *Ms* byly využity markery AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a AcPMS1 (Kim a kol., 2015). Velikostní markery (100 bp) jsou na gelech označeny písmenem L.

Na obrázku 4.1 můžeme vidět produkty PCR pro detekci lokusu *Ms*. Jsou to fragmenty, které byly amplifikovány pomocí markeru AcPMS1 (Kim a kol., 2015). Použité zkušební vzorky pocházejí z listů rostlin, které byly využity pro optimalizaci izolace DNA pomocí metody CTAB-PVP.

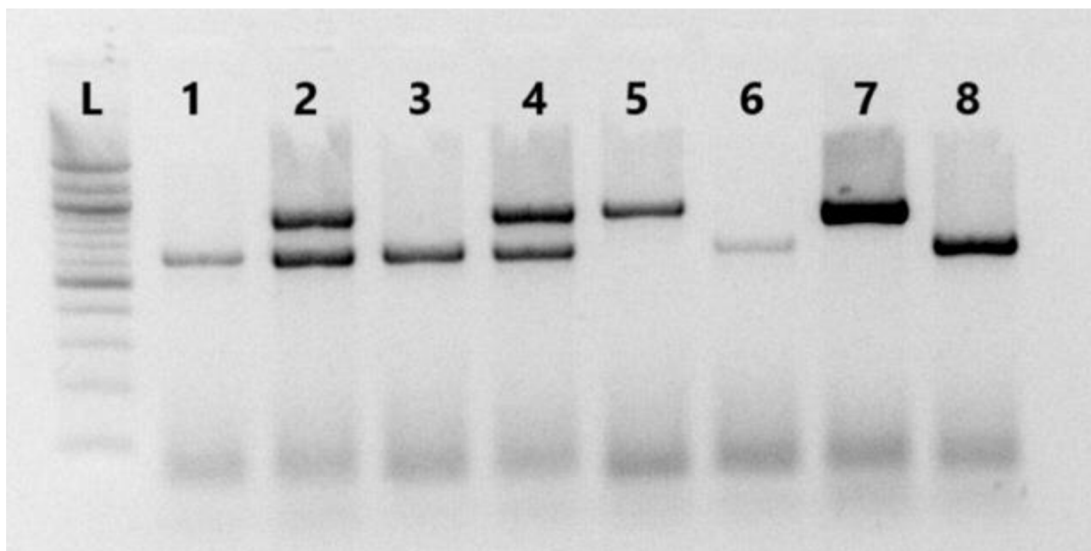
Amplifikované fragmenty jsou o délce 242 bp v případě výskytu dominantního homozygota (*MsMs*) (vzorky 5 a 7), 276 bp v případě recesivního homozygota (*msms*) (vzorky 1, 3, 6 a 8) a 242 a 276 bp v případě heterozygota (*Msms*) (vzorky 2 a 4). U všech těchto vzorků se podařilo detekovat lokus *Ms*. Čísla vzorků nejsou stejná jako v Tabulce 3.2.



Obrázek 4.1: Detekce lokusu *Ms* markerem AcPMS1

Na obrázku 4.2 můžeme vidět produkty PCR pro detekci lokusu *Ms*. Jsou to fragmenty, které byly amplifikovány pomocí markeru AcSKP1 (Huo a kol., 2015). Použité zkušební vzorky pocházejí z listů rostlin, které byly využity pro optimalizaci izolace DNA metodou CTAB-PVP.

Amplifikované fragmenty jsou o délce 898 bp v případě výskytu dominantního homozygota (*MsMs*) (vzorky 5 a 7), 628 bp v případě recesivního homozygota (*msms*) (vzorky 1, 3, 6 a 8) a 898 a 628 bp v případě heterozygota (*Msms*) (vzorky 2 a 4). U všech těchto vzorků se podařilo detekovat lokus *Ms*. Čísla vzorků nejsou stejná jako v Tabulce 3.2.



Obrázek 4.2: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1

Na základě tohoto testování jsme se rozhodli, že pro detekci lokusu *Ms* v PCR analýze našich hlavních vzorků použijeme marker AcSKP1, jelikož výsledky elektroforézy jsou díky tomuto markeru přehlednější a snáze se vyhodnocují. U markeru AcPMS1 jsou fragmenty velice podobné velikosti a na zobrazených gelech splývají. To ztěžuje jejich vyhodnocování.

4.2.2 Výsledky detekce CMS u zkušebních vzorků

Po provedení PCR a elektroforézy byly agarózové gely podsvíceny UV světlem a vyfotografovány a vyhodnoceny. Velikostní markery (100 bp) jsou označeny písmenem L.

Vzorky na zobrazených gelech byly amplifikovány pomocí markerů *cob*, *orfA501* a *orf725*. Marker *orfA501* (Engelke a kol., 2003) amplifikuje fragmenty o délce 473 bp v případě, že daná rostlina má CMS. Pokud je rostlina fertillní, tak se fragmenty neamplifikují.

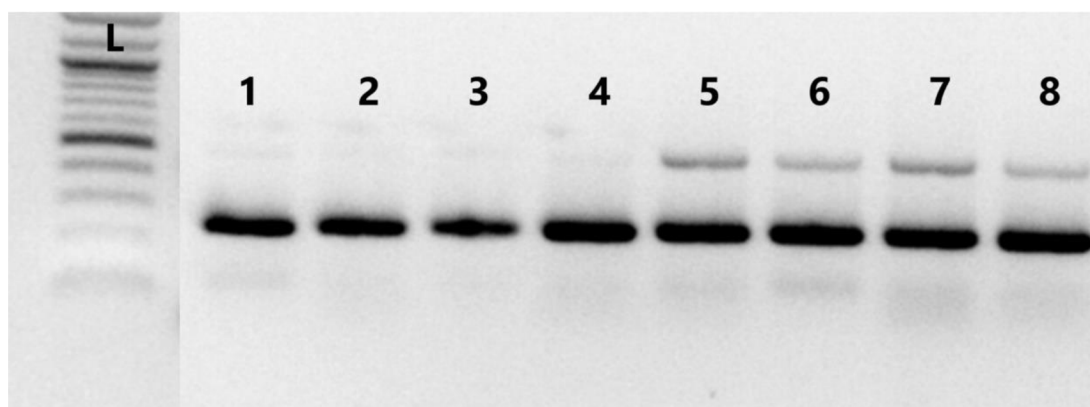
Marker *cob* (Sato, 1998) amplifikuje v systému CMS-S fragmenty o délce 180 a 414 bp. Naproti tomu rostliny se systémem CMS-T amplifikují fragmenty pouze o délce 180 bp a fragmenty s délkou 414 bp nejsou amplifikovány. Fertillní rostliny také amplifikují pouze fragmenty o délce 180 bp.

Pomocí těchto dvou markerů jsme schopni rozlišit rostliny, které jsou sterillní a které jsou fertillní. Následně je možné u sterillních rostlin rozlišit, zda se jedná o cytoplazmatickou samčí sterillitu typu “S“ nebo o typ “T“.

Marker *orf725* (Kim a kol., 2009) amplifikuje fragmenty o délce 833 bp v případě, že rostlina je fertlní, 628 bp v případě, že rostlina má samčí sterilitu typu “S” a 628 a 833 bp v případě, že rostlina má cytoplazmatickou samčí sterilitu typu “T”.

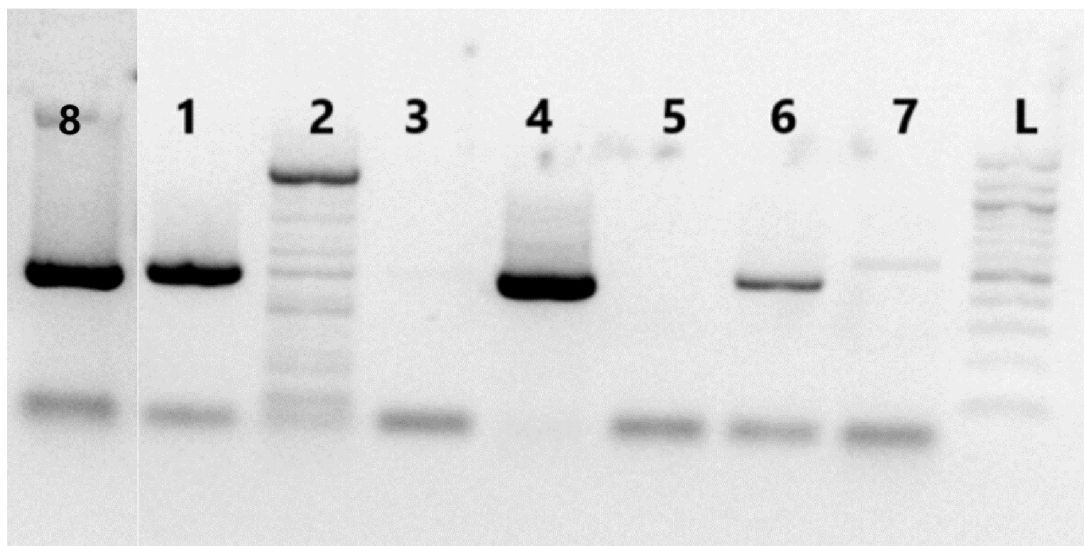
Použité zkušební vzorky pocházejí z listů rostlin, které byly využity pro optimalizaci izolace DNA metodou CTAB-PVP. Čísla vzorků nejsou stejná jako v Tabulce 3.2.

Na obrázku 4.3 můžeme vidět fragmenty DNA, které byly amplifikovány markerem *cob*. Vzorky 1, 2, 3 a 4 amplifikovaly pouze fragmenty o velikosti 180 bp. Vzorky 5, 6, 7 a 8 amplifikovaly fragmenty o délce 180 bp i fragmenty o délce 414 bp.



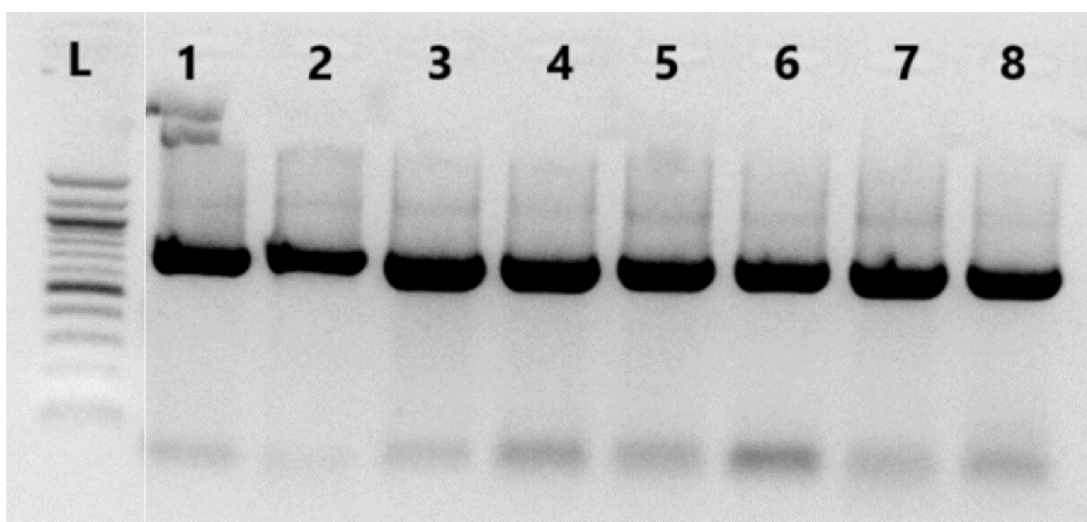
Obrázek 4.3: Detekce CMS – marker *cob*

Na obrázku 4.4 můžeme vidět fragmenty DNA, které byly amplifikovány markerem *orfA501*. Vzorky 1, 4, 6, 7 a 8 amplifikovaly fragmenty o délce 473 bp. Vzorky 3 a 5 neamplifikovaly žádné fragmenty. Vzorek 2 byl pravděpodobně během pipetování při přípravě elektroforézy zanesen velikostním markerem.



Obrázek 4.4: Detekce CMS – marker *orfA501*

Na obrázku 4.5 můžeme vidět fragmenty DNA, které byly amplifikovány pomocí markeru *orf725*. Tento marker lze používat a vyhodnocovat samostatně (markery *cob* a *orfA501* společně). U našich vzorků byly amplifikovány fragmenty, které lze jen těžko vyhodnotit. Jejich velikost se pohybuje okolo 700 bp. Jelikož nelze vyhodnotit výsledky PCR, která byla provedena pomocí markeru *orf725*, tak tento marker nevyhovuje našim účelům.



Obrázek 4.5: Detekce CMS – marker *orf725*

Porovnáním výsledků jsem se snažili rozhodnout, které markery jsou pro naše účely detekce CMS vhodnější. Rozhodli jsme se pro detekci CMS u hlavních vzorků použít marker *cob* a *orfA501* namísto markeru *orf725*. Marker *orf725* jsme nepoužili, jelikož

amplifikované fragmenty neměly potřebnou délku a také se mezi jednotlivými fragmenty vzorků nenacházely rozdíly (bez homozygotů recesivních a dominantních a heterozygotů).

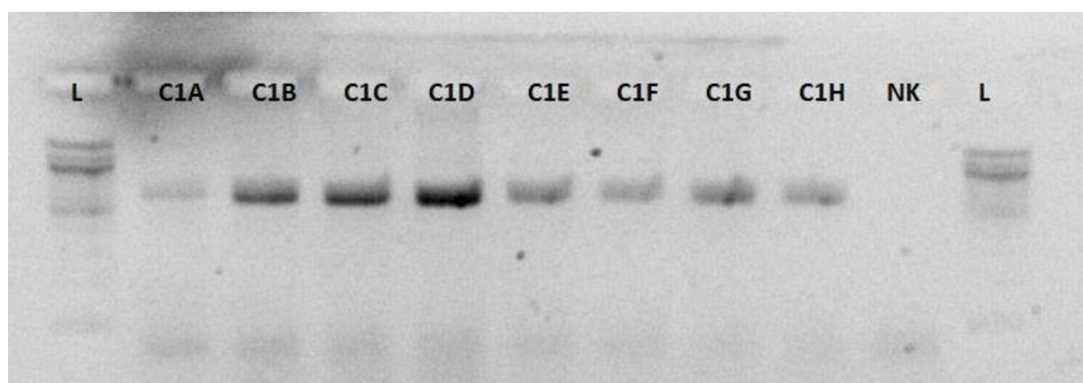
4.3 Výsledky PCR hlavních vzorků

4.3.1 Výsledky detekce lokusu *Ms* u hlavních vzorků

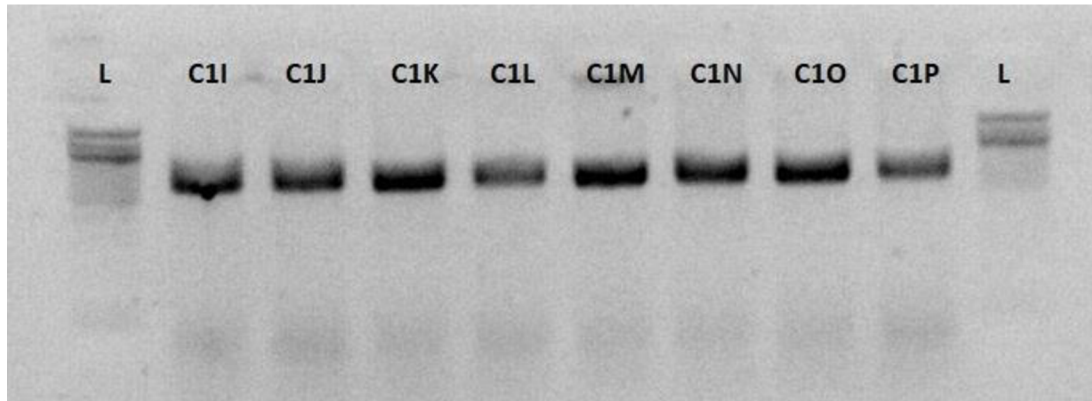
Po provedení PCR a elektroforézy byly agarózové gely podsvíceny UV světlem a vyfotografovány a vyhodnoceny. Negativní kontroly u všech vyfotografovaných gelů nejsou vidět, čili jsou opravdu negativní. Velikostní markery jsou označeny písmenem L. Všechny vzorky na zobrazených gelech byly amplifikovány markerem AcSKP1. Amplifikované vzorky rozdělujeme podle zygosity na:

1. dominantní homozygot *MsMs* 898 bp
2. recesivní homozygot *msms* 628 bp
3. heterozygot *Msms* 898 bp + 628 bp

Na obrázcích 4.6 a 4.7, které obsahují snímky gelu č. 1 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C1 podle jednotlivých týdnů (A až P). Je patrné, že rostliny linie C1 jsou recesivní homozygoti, kteří jsou příslušníky jedné linie. Velikost zaznamenaných fragmentů je 628 bp. Fragmenty byly zaznamenány i u vzorků nejstarších listů, čili lokus *Ms* byl úspěšně detekován u všech vzorků a to i jak u mladých rostlin, tak i u nejstarších. Díky tomu nebylo nutné měnit teplotní profil PCR oproti publikacím.



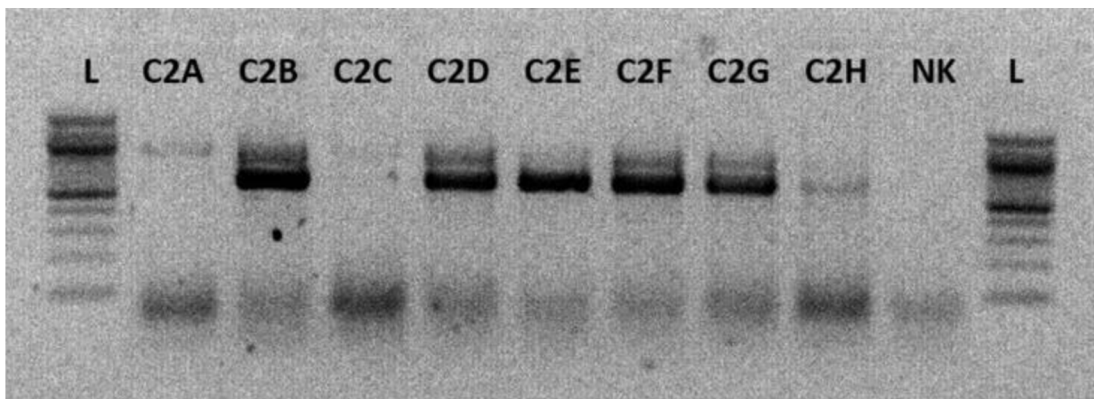
Obrázek 4.6: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C1A – C1H



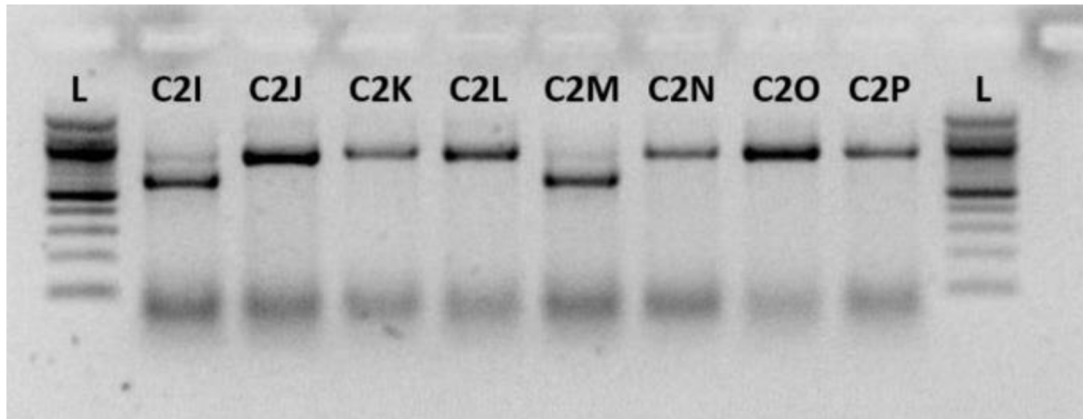
Obrázek 4.7: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C1I – C1P

Na obrázcích 4.8 a 4.9, které obsahují snímky gelu č. 2 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C2 podle jednotlivých týdnů (A až P). Na gelu je patrné, že různé vzorky jsou heterozygoti nebo homozygoti recesivní nebo homozygoti dominantní. To může být způsobeno náhodným sběrem vzorků, kdy byly odebrány listy cibule náhodně z různých pěti vypěstovaných rostlin stejné linie. Rozdíly v zygotnosti by naznačovaly, že linie C2 má různou genetickou výbavu, tudíž není linií.

Lokus *Ms* byl detekován u všech vzorků. Fragmenty byly zaznamenány i u vzorků nejstarších listů, čili lze detekovat lokus *Ms* jak u mladých rostlin, tak i u nejstarších. Velikost zaznamenaných fragmentů je 628 bp u recesivních homozygotů, 898 bp u dominantních homozygotů a 628 a 898 bp u heterozygotů. Teplotní profil ani průběh PCR nebylo nutné měnit oproti publikacím.



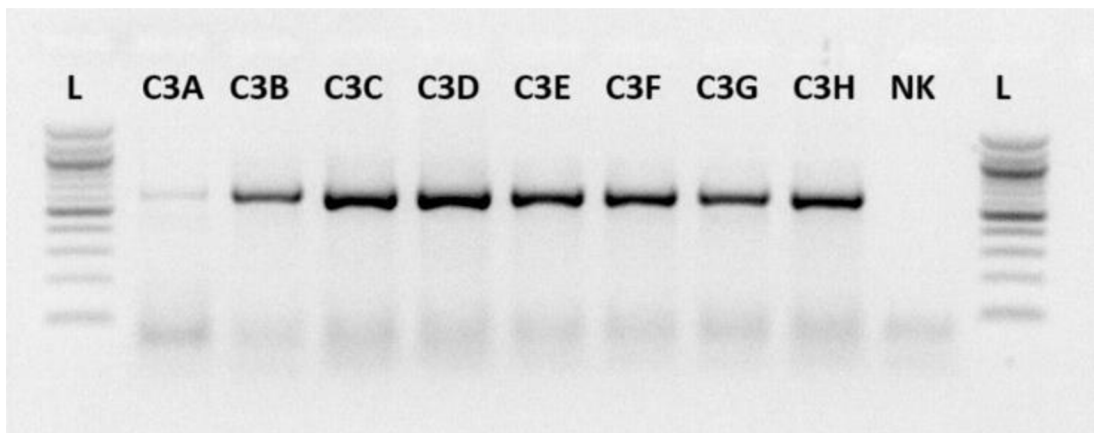
Obrázek 4.8: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C2A – C2H



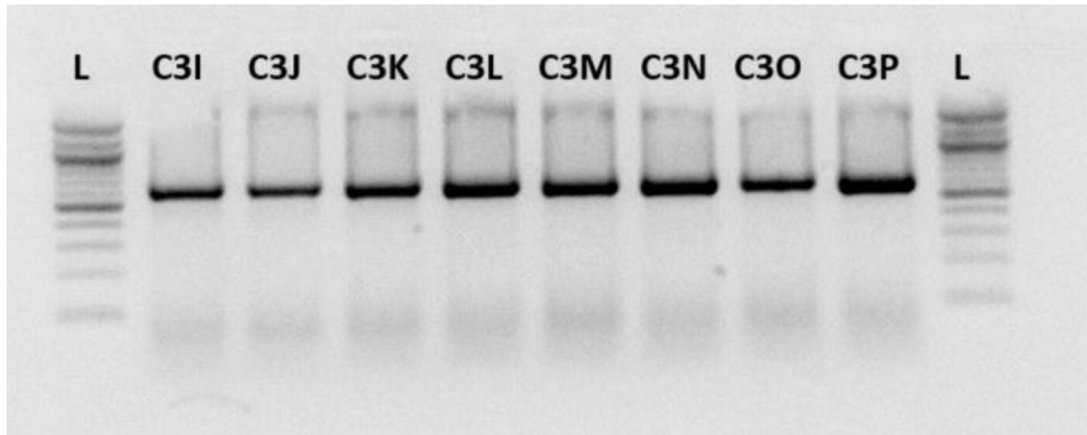
Obrázek 4.9: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C2I – C2P

Na obrázcích 4.10 a 4.11, které obsahují snímky gelu č. 3 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C3 podle jednotlivých týdnů (A až P). I u linie C3 byl detekován lokus *Ms* u všech vzorků a byl zachycen i u nejstarších rostlin. Na gelu jsou fragmenty DNA o velikosti 628 bp. Tato velikost je u všech fragmentů stejná a tudíž se jedná o linii recesivních homozygotů. Všechny vzorky jsou příslušníky jedné linie.

Teplotní gradient ani průběh PCR nebylo nutné měnit oproti publikacím.



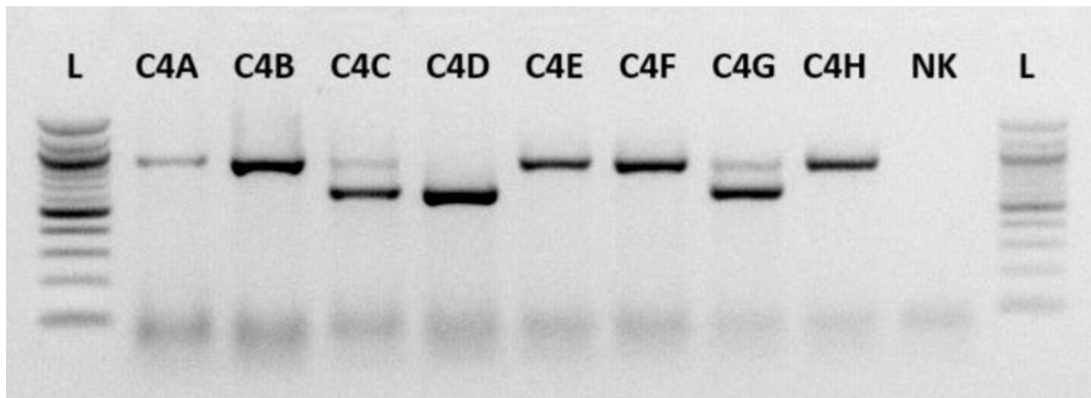
Obrázek 4.10: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C3A – C3H



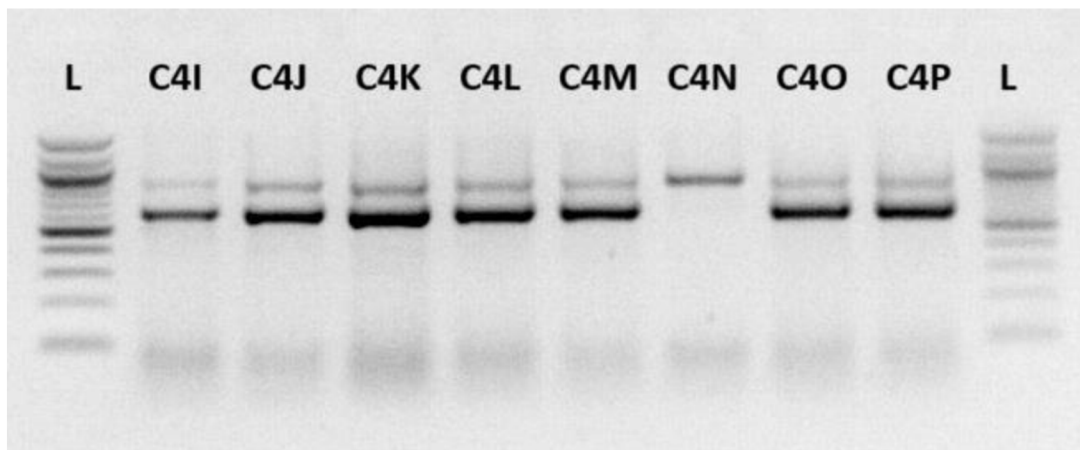
Obrázek 4.11: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C3I – C3P

Na obrázcích 4.12 a 4.13, které obsahují snímky gelu č. 4 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C4 podle jednotlivých týdnů (A až P). I zde se podařilo detekovat lokus *Ms* u všech zkoumaných vzorků a to i u nejstarších rostlin.

Na snímcích jsou vidět různé fragmenty různých velikostí (jak heterozygoti tak i homozygoti recesivní a dominantní). Tyto fragmenty naznačují různorodost genové výbavy jednotlivých rostlin v linii, což opět dokazuje, že se nejedná o linii. Teplotní profil ani průběh PCR nebylo nutné měnit oproti publikacím.



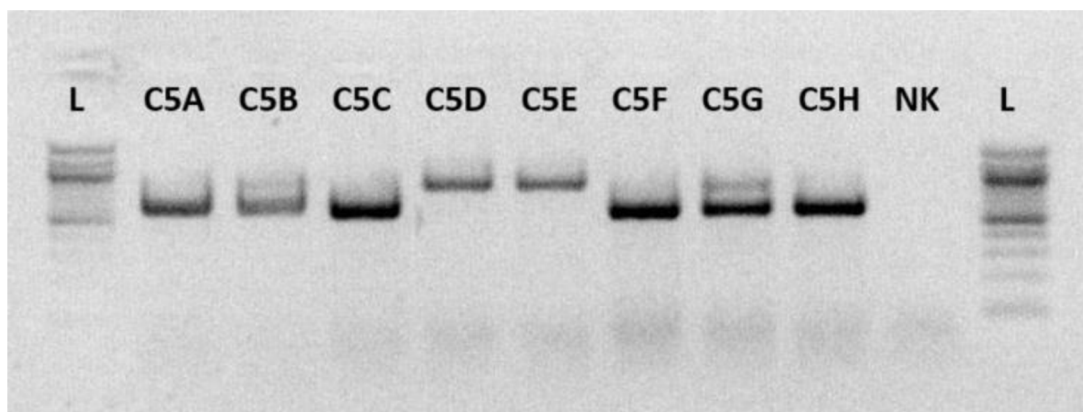
Obrázek 4.12: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C4A – C4H



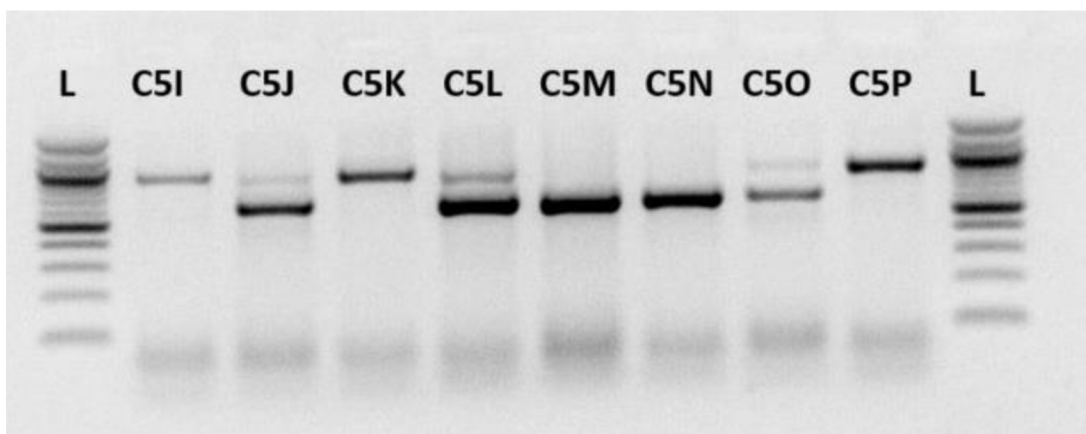
Obrázek 4.13: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C4I – C4P

Na obrázcích 4.14 a 4.15, které obsahují snímky gelu č. 5 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C5 podle jednotlivých týdnů (A až P). Detekce lokusu *Ms* byla i zde úspěšná. Gen se podařilo detekovat u všech vzorků a to i u nejstarších rostlin.

Jelikož jsou rostliny linie C5 stejnou linií jako rostliny linie C2, tak i zde jsou na snímcích vidět různé fragmenty různých velikostí (jak heterozygoti tak i homozygoti recesivní a dominantní). Teplotní profil ani průběh PCR nebylo nutné měnit oproti publikacím.



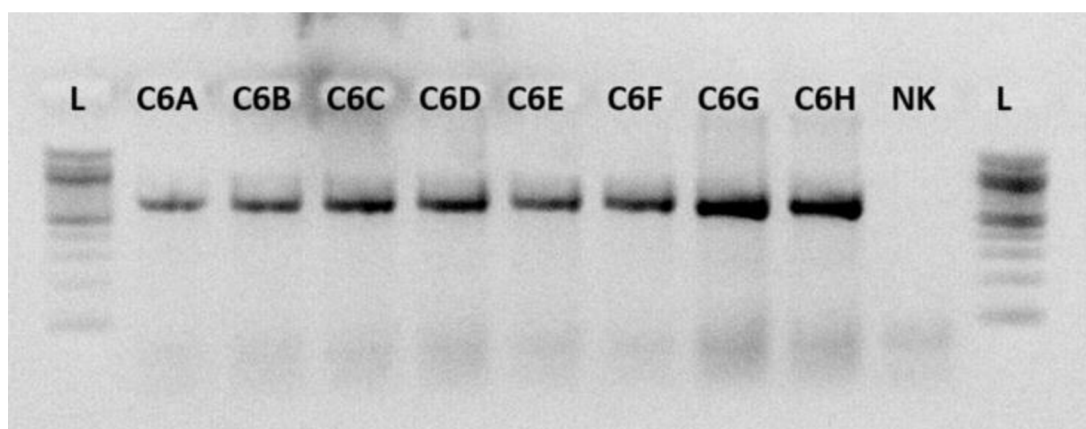
Obrázek 4.14: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C5A – C5H



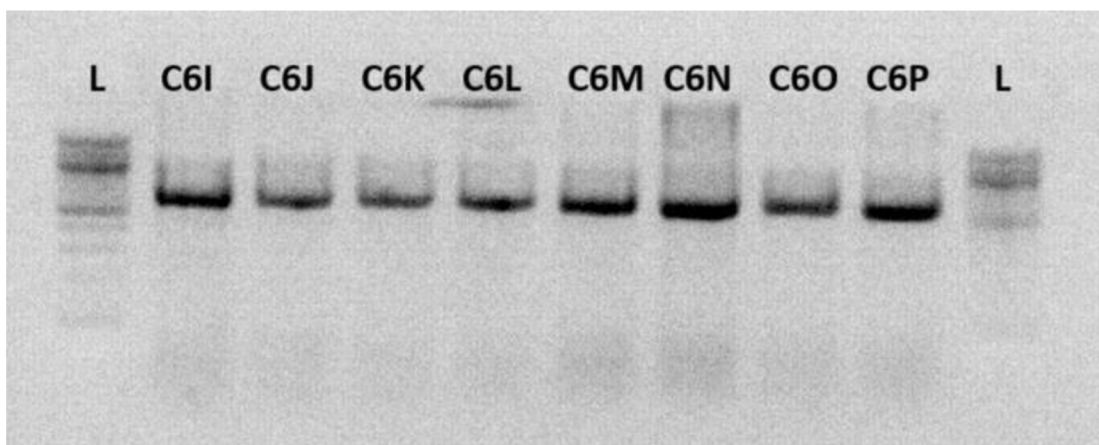
Obrázek 4.15: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C5I – C5P

Na obrázcích 4.16 a 4.17, které obsahují snímky gelu č. 6 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C6 podle jednotlivých týdnů (A až P). I u linie C6 byl detekován lokus *Ms* a to i u nejstarších rostlin.

Jelikož jsou rostliny linie C6 stejnou linií jako rostliny linie C3, tak i zde jsou na snímcích jsou vidět fragmenty stejné velikosti. Jedná se o fragmenty o velikosti 628 bp. To znamená, že tato linie je skutečně linií. Teplotní profil ani průběh PCR nebylo nutné měnit oproti publikacím.



Obrázek 4.16: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C6A – C6H



Obrázek 4.17: Detekce lokusu *Ms* markerem AcSKP1 – vzorky C6I – C6P

Ve všech provedených elektroforézách se podařilo detekovat lokus *Ms* u všech rostlin (i u nejstarších). Z toho důvodu nebylo nutné dále optimalizovat postup provedené PCR.

4.3.2 Výsledky detekce CMS u hlavních vzorků

Po provedení PCR a elektroforézy byly agarózové gely podsvíceny UV světlem a vyfotografovány a vyhodnoceny. Negativní kontroly u všech vyfotografovaných gelů nejsou vidět, čili jsou opravdu negativní. Velikostní markery jsou označeny písmenem L.

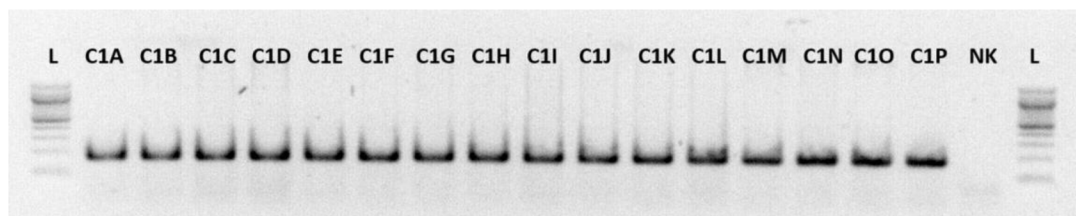
Hlavní vzorky na zobrazených gelech byly amplifikovány pomocí markerů *cob* a *orfA501*, které jsou na jednotlivých obrázcích rozděleny a popsány. Marker *orfA501* amplifikuje fragmenty o délce 473 bp v případě, že daná rostlina má cytoplazmatickou samčí sterilitu. Pokud je rostlina fertilní, tak se fragmenty neamplifikují. Marker *cob* amplifikuje v systému CMS-S fragmenty o délce 180 a 414 bp. Naproti tomu rostliny se systémem CMS-T amplifikují fragmenty pouze o délce 180 bp a fragmenty s délkou 414 bp nejsou amplifikovány. Fertilní rostliny také amplifikují pouze fragmenty o délce 180 bp. Pomocí těchto dvou markerů jsme schopni rozlišit rostliny, které jsou sterilní a které jsou fertilní. Následně je možné u sterilních rostlin rozlišit, zda se jedná o cytoplazmatickou samčí sterilitu typu “S” nebo o typ “T”.

Na obrázcích 4.18 a 4.19, které obsahují snímky gelu č. 1 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C1 podle jednotlivých týdnů (A až P).

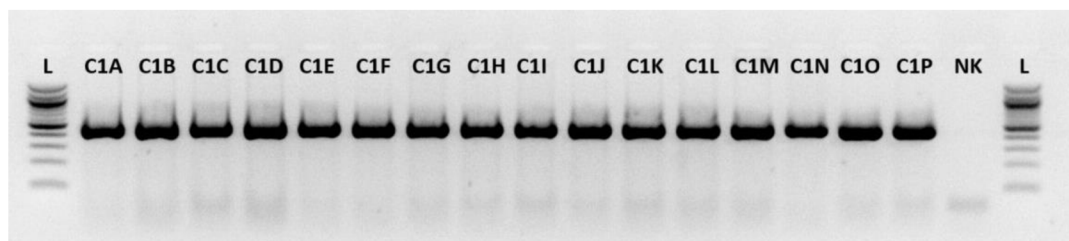
Na obrázku 4.18 jsou vidět fragmenty o délce 180 bp. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí markeru *cob*. Na gelu se nenachází fragmenty o délce 414 bp a tudíž nebyly amplifikovány.

Na obrázku 4.19 jsou vidět fragmenty o délce 473 bp, které byly amplifikovány u všech vzorků pomocí markeru *orfA501*.

Díky tomu jsme zjistili, že rostliny linie C1 jsou sterilní a mají CMS typu “T”.



Obrázek 4.18: Detekce CMS – linie C1 marker *cob*



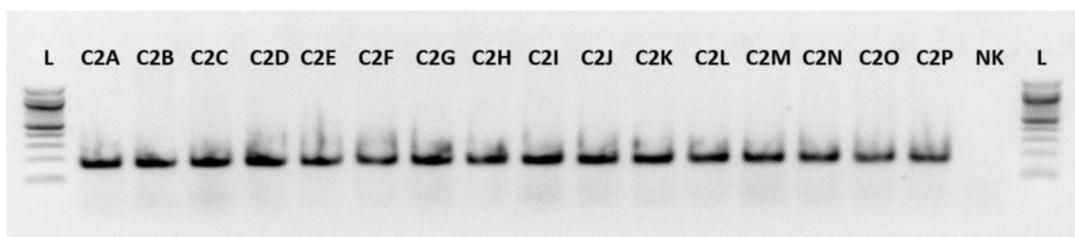
Obrázek 4.19: Detekce CMS – linie C1 marker *orfA501*

Na obrázcích 4.20 a 4.21, které obsahují snímky gelu č. 2 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C2 podle jednotlivých týdnů (A až P).

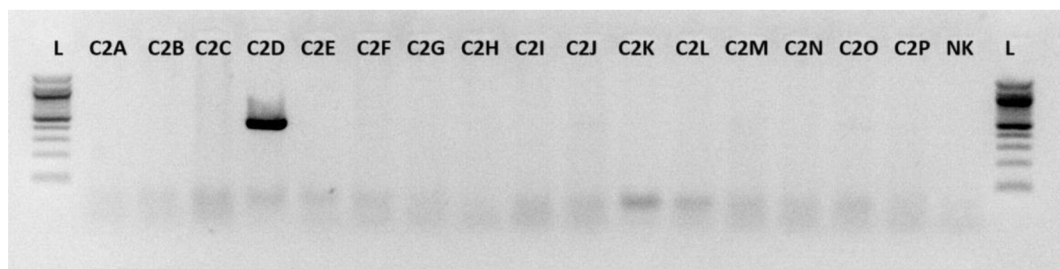
Na obrázku 4.20 jsou vidět fragmenty o délce 180 bp. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí markeru *cob*. Na gelu se nenachází fragmenty o délce 414 bp a tudíž nebyly amplifikovány.

Na obrázku 4.21 je vidět pouze jeden fragment o délce 473 bp, který byl amplifikovaný pomocí markeru *orfA501*. Tento fragment se nachází u vzorku C2D. U ostatních vzorků nebyly amplifikovány žádné fragmenty.

To znamená, že většina vzorků z line C2 je fertálních, ale pouze vzorek C2D je sterilní (jako u jediného byl amplifikován fragment o délce 473 bp). Vzorek C2D má CMS typu “T”.



Obrázek 4.20: Detekce CMS – linie C2 marker *cob*



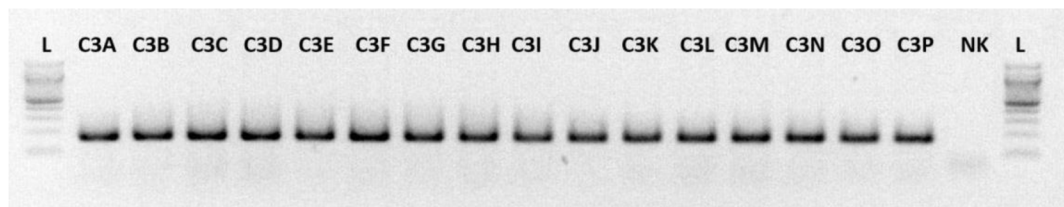
Obrázek 4.21: Detekce CMS – linie C2 marker *orfA501*

Na obrázcích 4.22 a 4.23, které obsahují snímky gelu č. 3 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C3 podle jednotlivých týdnů (A až P).

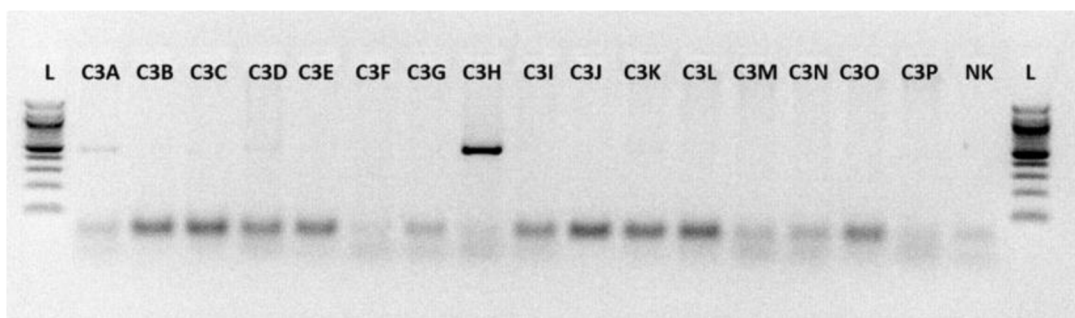
Na obrázku 4.22 jsou vidět fragmenty o délce 180 bp. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí markeru *cob*. Na gelu se nenachází fragmenty o délce 414 bp a tudíž nebyly amplifikovány.

Na obrázku 4.23 je výrazně vidět pouze jeden fragment u vzorku C3H a další tři fragmenty u vzorků C3A, C3C a C3D pouze slabě. Tyto fragmenty jsou délce 473 bp, které byly amplifikovány pomocí markeru *orfA501*. U ostatních vzorků nebyly amplifikovány žádné fragmenty.

To znamená, že vzorky C3A, C3C, C3D a C3H jsou sterilní a mají CMS typu “T“. Ostatní vzorky jsou fertillní.



Obrázek 4.22: Detekce CMS – linie C3 marker *cob*

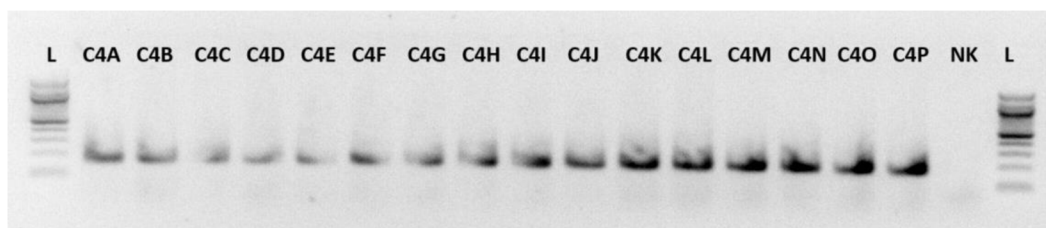


Obrázek 4.23: Detekce CMS – linie C3 marker *orfA501*

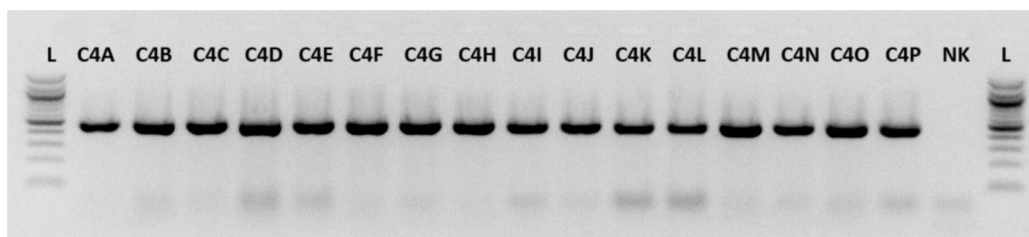
Na obrázcích 4.24 a 4.25, které obsahují snímky gelu č. 4 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C4 podle jednotlivých týdnů (A až P).

Na obrázku 4.24 jsou vidět fragmenty o délce 180 bp. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí markeru *cob*. Na gelu se nenachází fragmenty o délce 414 bp a tudíž nebyly amplifikovány.

Na obrázku 4.25 jsou vidět fragmenty o délce 473 bp, které byly amplifikovány u všech vzorků pomocí markeru *orfA501*. To znamená, že všechny vzorky z linie C4 jsou sterilní a mají CMS typu “T”.



Obrázek 4.24: Detekce CMS – linie C4 marker *cob*

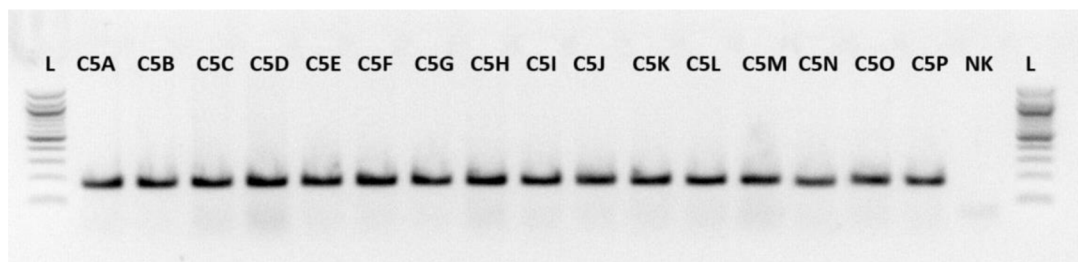


Obrázek 4.25: Detekce CMS – linie C4 marker *orfA501*

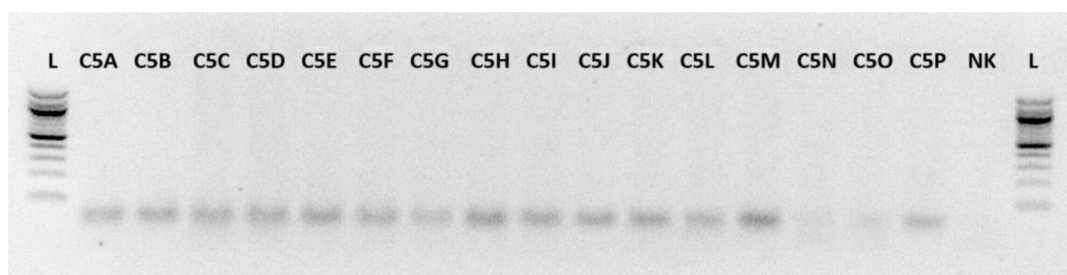
Na obrázcích 4.26 a 4.27, které obsahují snímky gelu č. 5 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C5 podle jednotlivých týdnů (A až P).

Na obrázku 4.26 jsou vidět fragmenty o délce 180 bp. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí markeru *cob*. Na gelu se nenachází fragmenty o délce 414 bp a tudíž nebyly amplifikovány.

Na obrázku 4.27 jsou produkty PCR pro marker *orfA501*. Na gelu nejsou vidět žádné fragmenty, čili žádný vzorek nebyl amplifikován pomocí markeru *orfA501*. To znamená, že veškeré vzorky z linie C5 jsou fertillní.



Obrázek 4.26: Detekce CMS – linie C5 marker *cob*

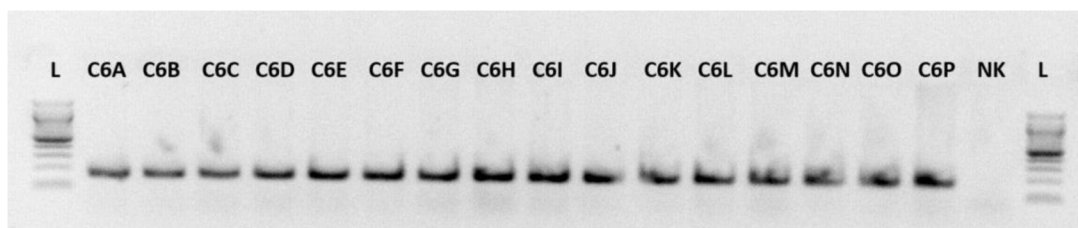


Obrázek 4.27: Detekce CMS – linie C5 marker *orfA501*

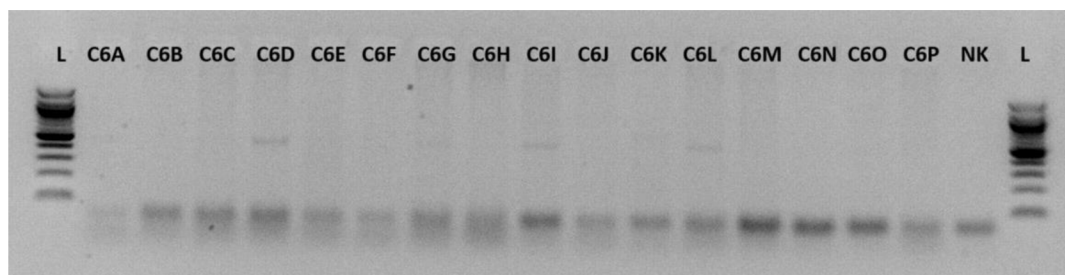
Na obrázcích 4.28 a 4.29, které obsahují snímky gelu č. 6 můžeme vidět jednotlivé fragmenty DNA vzorků linie C6 podle jednotlivých týdnů (A až P).

Na obrázku 4.28 jsou vidět fragmenty o délce 180 bp. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí markeru *cob*. Na gelu se nenachází fragmenty o délce 414 bp a tudíž nebyly amplifikovány.

Na obrázku 4.29 jsou vidět některé fragmenty pouze slabě. Konkrétně se jedná o fragmenty u vzorků C6A, C6D, C6G, C6I a C6L. Tyto fragmenty mají délku 473 bp a byly amplifikovány pomocí markeru *orfA501*. Těchto pět vzorků z linie C6 je sterillních a mají CMS typu “T“. Ostatní vzorky jsou fertillní.



Obrázek 4.28: Detekce CMS – linie C6 marker *cob*



Obrázek 4.29: Detekce CMS – linie C6 marker *orfA501*

4.4 Shrnutí výsledků

Z výsledků různých typů izolací DNA je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo izolací DNA pomocí metody CTAB-PVP. Čistota je podle měření na spektrofotometru pro nano objemy výrazně lepší než u ostatních metod extrakce DNA. Kvalita extrahované DNA nebyla poznamenána stářím rostliny, ze které byl vzorek odebíráán. I z nejmladších rostlin se podařilo extrahovat dostatečné množství DNA s dobrou kvalitou. U starších listů obsahové látky neovlivnily kvalitu a koncentraci výsledné DNA.

Detekce lokusu *Ms* u zkušebních vzorků byla úspěšná. Po vyhodnocení produktů PCR u našich zkušebních vzorků jsme se rozhodli, že nejvhodnějším markerem pro detekci lokusu *Ms* v našich hlavních vzorcích je marker AcSKP1. Produkty PCR získané pomocí markeru AcPMS1 nedosahovaly potřebných kvalit, jelikož amplifikované fragmenty byly podobné velikosti a hůře by se výsledky elektroforézy vyhodnocovaly. Z tohoto důvodu jsme se raději přiklonili k markeru AcSKP1, jehož produkty PCR jsou čitelnější.

Detekce CMS u zkušebních vzorků byla úspěšná s markery *cob* a *orfA501*. Produkty PCR, které byly amplifikovány pomocí markeru *orf725* nebylo možné vyhodnotit, jelikož fragmenty byly příliš blízko u sebe, neodpovídaly deklarované délce a mezi jednotlivými vzorky se nenacházely rozdíly. Z tohoto důvodu jsme se

rozhodli, že pro detekci CMS u našich hlavních vzorků využijeme markery *cob* a *orfA501*. Výsledky PCR těchto markerů bylo možné vyhodnotit a zjistit zda je rostlina sterilní a o jaký typ sterility se jedná.

U našich hlavních vzorků bylo díky provedené PCR metodě, která měla za cíl detekovat lokus *Ms*, dosaženo požadovaných výsledků a teplotní profil odpovídal převzatým publikacím. Detekce lokusu *Ms* byla úspěšná u všech vzorků, bez ohledu na věk rostliny. Detekce se podařila i u nejstarších rostlin, což znamená, že staré a plně vzrostlé rostliny neobsahují inhibiční látky, které by detekci ztěžovaly.

Jelikož bylo z každé linie vypěstováno pět rostlin, ze kterých se náhodným způsobem odebíraly vzorky, tak by vzorky z každé linie měly mít stejnou genetickou výbavu a to bez ohledu na to, o kterou rostlinu se jedná. Avšak u některých linií, u nichž se detekoval lokus *Ms*, má gen ovlivňující sterilitu různou podobu (*MsMs*, *Msms*, *msms*) To znamená, že ne všechny zkoumané linie jsou skutečně liniemi.

U linií s označením C2, C4 a C5 (rostliny linie s označením C5 jsou ze starších semen z roku 2020 a jsou stejné jako linie C2), byla prokázána přítomnost lokusu *Ms*, ale v podobě různých zygotností genu (*MsMs*, *Msms*, *msms*). To znamená, že linie C2 a C5 (B II fertlní) a C4 (B I sterilní) nejsou liniemi.

Naproti tomu linie s označením C1, C3 a C6 (rostliny linie s označením C6 jsou ze starších semen z roku 2019 a jsou stejné jako linie C3) mají stejnou genetickou výbavu.

Všechny vzorky rostlin z linie C1 (A I sterilní) mají fragmenty o délce 628 bp a to znamená, že jsou recesivní homozygoti (*msms*). Vzorky u rostlin z linií C3 a C6 (A II fertlní) mají také fragmenty o délce 628 bp a to znamená, že jsou recesivní homozygoti (*msms*).

Polymerázová řetězcová reakce pro detekci CMS ukázala, že u všech vzorků všech linií se podařilo amplifikovat fragmenty o velikosti 180 bp pomocí markeru *cob*. Naproti tomu se u žádného vzorku nepodařilo pomocí markeru *cob* amplifikovat fragmenty o velikosti 414 bp.

U všech vzorků z linií C1 (A I sterilní) a C4 (B I sterilní) se pomocí markeru *orfA501* podařilo amplifikovat fragmenty DNA o velikost 473 bp. To znamená, že všechny rostliny těchto dvou linií jsou sterilní. Jelikož nebyly u žádného vzorku amplifikovány fragmenty o délce 414 bp, tak to znamená, že dané rostliny mají CMS typu "T".

Vzhledem k tomu, že u rostlin linie C1 byl detekován lokus *Ms* a bylo prokázáno, že všechny rostliny jsou recesivními homozygoty, je linie C1 nejlepší pro následující šlechtění.

U linie C4 byl prokázán lokus *Ms* v různých podobách zygotnosti, což znamená, že není linií, nicméně byla také u všech vzorků detekována CMS. To znamená, že rostliny lze využít pro hybridizaci.

U vzorků s označením C2 a C5 (linie B II fertílní) bylo zjištěno, že rostliny této linie mají různou podobu zygotnosti lokusu *Ms* a pouze jeden vzorek (C2D) amplifikoval fragment DNA o velikosti 473 bp pomocí markeru *orfA501*. To znamená, že pouze tato jedna rostlina je sterilní (CMS-T). U ostatních vzorků se fragmenty pomocí markeru *orfA501* neamplifikovaly a proto jsou tyto rostliny fertílní. Tyto výsledky ukazují, že linie B II fertílní není vhodná pro hybridizaci.

U všech vzorků s označením C3 a C6 (linie A II fertílní) byl detekován lokus *Ms* v jedné podobě a to jako recesivní homozygot (*msms*). Avšak během detekce CMS bylo zjištěno, že rostliny vzorků C3A, C3C, C3D, C3H, C6A, C6D, C6G, C6I a C6L amplifikovaly pomocí markeru *orfA501* fragmenty DNA o velikosti 473 bp. To znamená, že rostliny z těchto vzorků jsou sterilní (CMS-T) i přesto, že rostliny linie A II fertílní by měly být všechny fertílní. Ostatní vzorky neamplifikovaly žádné fragmenty pomocí markeru *orfA501* a proto jsou fertílní. Na základě těchto zjištění není vhodné použít linii A II fertílní pro hybridizaci.

U všech linií, které byly deklarovány jako sterilní byla skutečně cytoplazmatická samčí sterilita prokázána. Naproti tomu u linií, které byly označeny jako fertílní byly nalezeny rostliny, které se prokázaly jako sterilní.

Jelikož se u žádného sterilního vzorku neamplifikovaly fragmenty o velikosti 414 bp, tak to znamená, že tyto rostliny mají CMS typu "T".

Tabulka 4.3: Shrnutí výsledků hlavních vzorků

Vzorek	sterilní/fertílní	zygotnost (<i>Ms</i>)	typ sterility
C1A	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1B	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1C	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1D	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T

C1E	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1F	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1G	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1H	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1I	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1J	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1K	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1L	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1M	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1N	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1O	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C1P	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C2A	fertilní	<i>MsMs</i>	
C2B	fertilní	<i>Msms</i>	
C2C	fertilní	<i>Msms</i>	
C2D	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C2E	fertilní	<i>msms</i>	
C2F	fertilní	<i>Msms</i>	
C2G	fertilní	<i>Msms</i>	
C2H	fertilní	<i>msms</i>	
C2I	fertilní	<i>Msms</i>	
C2J	fertilní	<i>MsMs</i>	
C2K	fertilní	<i>MsMs</i>	
C2L	fertilní	<i>MsMs</i>	
C2M	fertilní	<i>Msms</i>	
C2N	fertilní	<i>MsMs</i>	
C2O	fertilní	<i>MsMs</i>	
C2P	fertilní	<i>MsMs</i>	
C3A	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C3B	fertilní	<i>msms</i>	
C3C	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T

C3D	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C3E	fertilní	<i>msms</i>	
C3F	fertilní	<i>msms</i>	
C3G	fertilní	<i>msms</i>	
C3H	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C3I	fertilní	<i>msms</i>	
C3J	fertilní	<i>msms</i>	
C3K	fertilní	<i>msms</i>	
C3L	fertilní	<i>msms</i>	
C3M	fertilní	<i>msms</i>	
C3N	fertilní	<i>msms</i>	
C3O	fertilní	<i>msms</i>	
C3P	fertilní	<i>msms</i>	
C4A	sterilní	<i>MsMs</i>	CMS-T
C4B	sterilní	<i>MsMs</i>	CMS-T
C4C	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4D	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C4E	sterilní	<i>MsMs</i>	CMS-T
C4F	sterilní	<i>MsMs</i>	CMS-T
C4G	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4H	sterilní	<i>MsMs</i>	CMS-T
C4I	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4J	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4K	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4L	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4M	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4N	sterilní	<i>MsMs</i>	CMS-T
C4O	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C4P	sterilní	<i>Msms</i>	CMS-T
C5A	fertilní	<i>msms</i>	
C5B	fertilní	<i>Msms</i>	

C5C	fertilní	<i>msms</i>	
C5D	fertilní	<i>MsMs</i>	
C5E	fertilní	<i>MsMs</i>	
C5F	fertilní	<i>msms</i>	
C5G	fertilní	<i>Msms</i>	
C5H	fertilní	<i>msms</i>	
C5I	fertilní	<i>MsMs</i>	
C5J	fertilní	<i>Msms</i>	
C5K	fertilní	<i>MsMs</i>	
C5L	fertilní	<i>Msms</i>	
C5M	fertilní	<i>msms</i>	
C5N	fertilní	<i>msms</i>	
C5O	fertilní	<i>Msms</i>	
C5P	fertilní	<i>MsMs</i>	
C6A	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C6B	fertilní	<i>msms</i>	
C6C	fertilní	<i>msms</i>	
C6D	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C6E	fertilní	<i>msms</i>	
C6F	fertilní	<i>msms</i>	
C6G	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C6H	fertilní	<i>msms</i>	
C6I	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C6J	fertilní	<i>msms</i>	
C6K	fertilní	<i>msms</i>	
C6L	sterilní	<i>msms</i>	CMS-T
C6M	fertilní	<i>msms</i>	
C6N	fertilní	<i>msms</i>	
C6O	fertilní	<i>msms</i>	
C6P	fertilní	<i>msms</i>	

5 Diskuse

Během optimalizace izolace DNA jsme použili celkem čtyři typy izolací. Konkrétně se jedná o izolaci DNA pomocí CTAB-PVP, izolaci pomocí izolačního robota a izolaci pomocí kitů DNeasy Plant Pro a Plant Kits (Qiagen, Německo).

Nejlepší výsledky izolace DNA nám přinesla metoda izolace pomocí CTAB-PVP. Postup izolační metody jsme převzali z publikace od Doyle J. (1991), který jsme na začátku upravili pro naše potřeby. Tento postup se využívá pro izolaci genomové DNA u rostlin. Díky tomuto postupu izolace jsme byli schopni extrahovat dostatečné množství DNA, aniž by byl vzorek kontaminován velkým množstvím nežádoucích nečistot. Díky tomuto postupu jsme získali kvalitní extrahovanou DNA a nebylo nutné náš postup dále měnit.

Scobeyeva a kol. (2018) ve své práci porovnávali různé metody izolace DNA z rostlinných pletiv. Využité metody byly extrakce pomocí CTAB-PVP a extrakce pomocí komerčních kitů MagnoPrime Uni a MagnoPrime Fast (NextBio, Rusko).

Podle jejich výsledků lze pomocí metody CTAB-PVP vyextrahovat kvalitní DNA bez nežádoucích látek a to bez ohledu na množství použitého rostlinného pletiva. Naproti tomu se v případě izolace pomocí komerčních kitů muselo snížit množství izolovaného pletiva. Až poté byla izolace DNA úspěšná, ale výsledná kvalita nedosahovala takových hodnot jako vyizolovaná DNA pomocí metody CTAB-PVP. Následná provedená PCR byla úspěšná a mezi produkty z různých metod extrakce DNA nebyly významné rozdíly. Díky tomu Scobeyeva a kol. (2018) uvádějí, že všechny použité metody jsou vhodné pro extrakce DNA, ale metody pomocí komerčních kitů mají výhodu v časové úspornosti.

Metody extrakce DNA porovnávali i Jabeen a kol. (2022). Ve své práci porovnávali extrakci DNA pomocí CTAB-PVP a pomocí komerčních kitů GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, USA). DNA získaná z metody CTAB-PVP měla dostatečnou koncentraci i čistotu. DNA, kterou získali pomocí komerčních kitů dosahovala lepších výsledků než metoda CTAB-PVP. Z tohoto důvodu Jabeen a kol. (2022) doporučují používat metodu extrakce pomocí kitů pro vzorky u nichž je potřeba získat vysoce kvalitní DNA a metodu CTAB-PVP v případě velkého množství vzorků u nichž rozhoduje celková cena izolace.

V našem případě jsme pro PCR použili vzorky izolované pomocí CTAB-PVP metody, protože výsledky izolace DNA pomocí kitů neměly dostatečnou kvalitu a

nebyly pro PCR vhodné. Kvalita a čistota extrahované DNA nebyla zdaleka na takové úrovni jako u izolace pomocí CTAB-PVP. To může být způsobeno tím, že námi použité kity nejsou vyhovující pro námi izolované vzorky i přes to, že jsou přímo určeny pro izolaci rostlinné DNA. Také mohlo dojít k nedostatečné lýzi buněk či ke špatnému promytí DNA skrze křemíkovou membránu. V případě využití jiných typů kitů by se kvalita extrahované DNA mohla zlepšit.

Metoda CTAB-PVP přináší nejkvalitnější výsledky pro extrakci DNA z rostlinných pletiv. Tato metoda je stále hojně využívána i přes to, že patří mezi časově náročnější metody.

Izolace DNA pomocí izolačního robota MagCore je oproti izolaci pomocí CTAB-PVP výrazně snazší, jelikož izolaci provádí sám robot podle nastavení. Z této izolace jsme však získali malé nebo žádné množství DNA s velkým množstvím nežádoucích látek i přes to, že byl použit kit přímo pro rostlinný materiál. To mohlo být způsobeno nevyhovujícím postupem izolace, která byla provedena podle nastavení, kdy mohlo dojít ke špatnému promytí vzorků a tím pádem ke snížení kvality extrahovaných vzorků.

Pro detekci lokusu *Ms* jsme u našich zkušebních vzorků vyzkoušeli marker AcSKP1 (Huo a kol., 2015) a marker AcPMS1 (Kim a kol., 2015). Tyto markery se po provedené PCR a elektroforéze mezi sebou porovnávaly. Podle výsledků byl vhodnějším markerem AcSKP1 a to z toho důvodu, že amplifikované fragmenty byly dostatečně daleko od sebe a bylo možné je snadno rozeznat a vyhodnotit zygotnost daného vzorku. Naproti tomu marker AcPMS1 amplifikoval fragmenty, jejichž délka byla velice podobná a jejich rozeznání a vyhodnocení bylo obtížnější. Z těchto důvodů se marker AcSKP1 použil pro detekci lokusu *Ms* v našich hlavních vzorcích.

Pro detekci CMS u zkušebních vzorků byly využity markery *cob* (Sato, 1998), *orfA501* (Engelke a kol. 2003) a *orf725* (Kim a kol., 2009). Markery *cob* a *orfA501* se musí používat a vyhodnocovat společně. Marker *orf725* se používá a vyhodnocuje samostatně. Po vyhodnocení výsledků PCR se ukázalo, že markery *cob* a *orfA501* jsou vhodné pro detekci CMS a i pro následné určení typu sterility. Naproti tomu marker *orf725* nedosáhl požadovaných výsledků. Amplifikované fragmenty nebylo možné rozeznat a nedosahovaly požadované délky. To může být způsobeno tím, že marker *orf725* byl vyvinut na základě asijských odrůd cibule. Z toho důvodu nemusí být tento marker vhodný pro evropské odrůdy, které jsme pro detekci CMS využili my. Proto

jsme se rozhodli pro detekci CMS u našich hlavních vzorků použít markery *cob* a *orfA501*.

Pro detekci lokusu *Ms* u hlavních vzorků se využil marker AcSKP1 (Huo a kol., 2015). Detekce byla díky tomuto markeru úspěšná. Ferreira a kol. (2017) ve své práci také využili tento marker a získali také pozitivní výsledky. Naše hypotéza, že starší rostliny by mohly obsahovat inhibující látky, které by případně komplikovaly detekci lokusu se nenaplnila. Lokus byl detekován u všech vzorků bez ohledu na stáří rostliny.

Pokud porovnáme naše výsledky detekce lokusu *Ms* s výsledky z práce Ferreira a kol. (2017), tak zjistíme, že některé naše vzorky se liší v genetické výbavě. U některých našich vzorků se vyskytly podoby hledaného genu v různých formách (*MsMs*, *Msms*, *msms*). To znamená, že některé z linií, které byly testovány nejsou ve skutečnosti liniemi, což by mohlo ztěžovat případnou hybridizaci daných rostlin.

Během detekce různých typů CMS u hlavních vzorků jsme využili markery *cob* (Sato, 1998) a *orfA501* (Engelke a kol., 2003). Díky těmto markerům jsme byli schopni určit typ CMS, který se nacházel v našich vzorcích rostlin. Odhalili jsme, že všechny vzorky rostlin, které byly sterilní, tak mají typ sterility CMS-T. Ukázalo se, že tento typ sterility je také závislý na lokusu *Ms*, což podporuje hypotézu, kterou ve své práci uvedl Kim (2014). Dále se nám podařilo zjistit, že ne všechny linie, které byly deklarovány jako fertlní jsou skutečně fertlními. Mezi fertlními vzorky jsme detekovali i několik sterilních vzorků s CMS-T. To může být způsobeno nesprávnou hybridizací. Markery *cob* a *orfA501* byly využity i v práci od Ferreira a kol. (2017). V jejich práci se také podařilo detekovat typy CMS v jejich vzorcích, ale na rozdíl od našich vzorků obsahovaly jejich vzorky i rostliny s CMS-S.

Závěr

Tato práce si kladla za cíl optimalizovat jednotlivé postupy extrakce DNA z rostlin cibule kuchyňské a následně použít DNA pro optimalizaci detekce lokusu *Ms* a cytoplazmatické samčí sterility (CMS).

Jako nejvhodnější typ izolace DNA vyšla metoda pomocí CTAB-PVP, která poskytla nejlepší výsledky extrahované DNA. Díky kvalitě izolované DNA nebylo nutné dále metodu izolace upravovat a námi zvolený postup dostačoval.

Během optimalizace detekce lokusu *Ms* se podařilo detekovat lokus *Ms* u všech hlavních vzorků. Lokus *Ms* byl detekován i u nejstarších rostlin, což ukazuje že starší rostliny neobsahují inhibiční látky, které by detekci znesnadňovaly.

Ovšem bylo také zjištěno, že ne všechny zkoumané linie jsou liniemi, protože některé vzorky měly rozdílnou genetickou výbavu (zygotnost). To může být způsobeno chybou během šlechtění zkoumaných rostlin.

Detekce cytoplazmatické samčí sterility (CMS) byla u některých linií hlavních vzorků úspěšná. Linie, které byly deklarované jako sterilní byly skutečně sterilními. Linie označované jako fertlní obsahovaly několik vzorků, které se ukázaly jako sterilní. To může být způsobeno chybným šlechtěním.

Rostliny, které byly identifikovány jako sterilní, tak obsahují cytoplazmatickou samčí sterilitu typu "T".

Tyto výsledky ukazují, že využívání molekulárních markerů ve šlechtění cibule kuchyňské může významným způsobem přispět ke zjednodušení celého postupu šlechtění. Markery, které se využívají pro detekci sterility a následným určením typu CMS, jsou významným nástrojem v rostlinné produkci a jejich výzkum by měl patřit mezi priority moderního zemědělství.

Seznam použité literatury

1. Agriinfo.in, (2016). *Male Sterility*. [online] [cit. 2. 3. 2024]. Dostupné z: <https://agriinfo.in/male-sterility-1752/>
 2. AgroBio Opava, s.r.o., (2023). *Poradna pro dům a zahradu*. [online] [cit. 4. 2. 2024]. Dostupné z: <https://agrobio.cz/poradna/clanek/69>
 3. Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093. ISSN: 2405-8440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093>
 4. Beran, P., Jozová, E., Stehlíková, D., Hejna, O., Hoštičková, I., Rost, M. Čurn, V. (2022). *Základy metod molekulární biologie*. KOPP nakladatelství, České Budějovice. ISBN 978-807-3949-563.
 5. Brown, T. A. (2010). *Gene cloning and DNA analysis : an introduction*. 6. vydání. Blackwell Publishing, Chichester. ISBN 978-1-4443-3407-4.
 6. Cohan S. M., Weigle J. L. (1966). Chemically Induced Male Sterility in Onion (*Allium cepa*). *HortScience*, 1(1):16
 7. Datta, D., Gupta, S., Chaturvedi, S. K., Nadarajan, N. (2011). *Molecular Markers in Crop Improvement*. Army Printing Press. Indian Institute of Pulses Research, Kanpur - 208 024
 8. Doyle, J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G. M., Johnston, A. W. B. a Young, J. P. W., Eds., *Molecular Techniques in Taxonomy*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 283–293. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
 9. Eckardt, N. A. (2006). Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration. *The Plant Cell*, 18:515–517
 10. Engelke, T., Terefe D., Tatlioglu T. (2003). A PCR-based marker system monitoring CMS-(S), CMS-(T) and (N)-cytoplasm in the onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107:162–167. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1230-3>
 11. Ferreira, R. R., Santos, C. A. F., Oliveira, V. R. (2017). Fertility restoration locus and cytoplasm types in onion. *Genetics and Molecular Research*. 16(3) DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039766>
 12. González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L., González-Pérez, E., Guerrero-Aguilar, B. Z., Villalobos-Reyes, S. (2023). Identification of sources
-

-
- of cytoplasmic male sterility in onion (*Allium cepa* L.) germplasm using molecular markers. *Quest Journals Journal of Research in Agriculture and Animal Science*. 10(3):63–70
13. Havey, M. J. a Kim, S. (2021). Molecular Marker Characterization of Commercially Used Cytoplasmic Male Sterilities in Onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 146(5):351–355. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS05083-21>
 14. Huo, Y. M., Liu, B. J., Yang, Y. Y., Miao, J., Gao, L. M., Kong, S. P., Wang, Z. B., Kitano, H., Wu, X. (2015). AcSKP1, a multiplex PCR-based co-dominant marker in complete linkage disequilibrium with the male-fertility restoration (*Ms*) locus, and its application in open-pollinated populations of onion. *Euphytica*, 204: 711–722. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1374-7>
 15. Jabeen, R., Habiba, U., Khalid, S., Shirazi, J. (2022). Extraction and comparison of quality and purity of DNA of medicinal plants by CTAB and kit method. *Journal of Contemporary Pharmacy*. 6(1):19–22
 16. Jones H. A. a Emsweller S. L. (1933). Methods of Breeding Onions. *Hilgardia A Journal Of Agricultural Science*, 7(16):625–642
 17. Jones, H. A. a Clarke A. (1943) Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *American Society for Horticultural Science*, 43:189–194
 18. Kim, S. (2014). A codominant molecular marker in linkage disequilibrium with a restorer-of-fertility gene (*Ms*) and its application in reevaluation of inheritance of fertility restoration in onions. *Molecular Breeding*, 34:769–778. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0073-8>
 19. Kim, S. a Yoon, M. K. (2010). Comparison of mitochondrial and chloroplast genome segments from three onion (*Allium cepa* L.) cytoplasm types and identification of a trans-splicing intron of *cox2*. *Current Genetics*, 56:177–188. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0290-6>
 20. Kim, S., Kim, C. W., Park, M. Choi, D. (2015). Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. *Theoretical and Applied Genetics* 128:2289–2299. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2584-z>
-

-
21. Kocourek, F., Koudela, M., Jursík, M., Rod, J., Holý, K., Kovaříková, K. (2016). *Technologie pěstování a ochrany cibule v systému integrované produkce: uplatněná technologie 2016*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. ISBN 978-80-7427-214-1.
 22. Kresánek, J. (1977). *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*. Ilustroval Krejča, J. Osveta, Martin. ISBN (Váz.).
 23. Krishnamurthy, K. S., Saji, K. V., Srinivasan, V., Dinesh, R., Tamil, S. M., Anandaraj, M. (2011). (Eds.). *Souvenir and Abstracts, National symposium on spices and aromatic crops (SYMSAC VI): Exploiting spices production potential of the Deccan region*. Indian Society for Spices, Kozhikode, Kerala, India. pp. 20.
 24. Kubala, J. (2018). *9 Impressive Health Benefits of Onions*. [online] Healthline Media LLC. [cit. 5. 12. 2023]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/nutrition/onion-benefits>
 25. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H., (2012). *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*. Journal of Visualized Experiments. (62). ISSN 1940-087X. DOI: doi:10.3791/3923
 26. Mahajan, V. a Gupta, A. J. (2023). Onion: Breeding and Genomics. *Vegetable Science* 50:244–260. ISSN- 2455-7552
 27. Mainkar, P., Manape, T. K., Satheesh, V., Anandhan, S. (2023). CRISPR/Cas9-mediated editing of *PHYTOENE DESATURASE* gene in onion (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 14:1226911. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1226911>
 28. Manjunathagowda, D. C., Muthukumar, P., Gopal, J., Prakash, M., Bommesh, J. C., Nagesh, G. C., Megharaj, K. C., Manjesh, G. N., Anjanappa, M. (2021). Male sterility in onion (*Allium cepa* L.): origin: origin, evolutionary status, and their prospectus. *Genet Resour Crop Evol* 68:421–439. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-020-01077-1>
 29. Martínez, L. M. (2023). *Magnetic DNA Purification: History and recent developments*. [online] Sepmag.eu [cit. 26. 11. 2023]. Dostupné z: <https://www.sepmag.eu/blog/magnetic-dna-purification-history-recent-developments>
 30. Méndez-García, C., Bargiela, R., Martínez-Martínez, M., Ferrer, M. (2018). *Metagenomics*. Kapitola 2 – *Metagenomic Protocols and Strategies*. Academic
-

Press. pp. 15–54. ISBN: 9780081022689. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00002-1>

31. Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F. S. (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, DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
 32. Patzold, F., Zilli, A., Hundsdoerfer, A. K. (2020). Advantages of an easy-to-use DNA extraction method for minimal-destructive analysis of collection specimens. *PLoS One* 15(7):e0235222. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235222>
 33. Pečinka, A. (2020). *Jaká bude budoucnost šlechtění rostlin?*. [online] Nová Botanika, 1:34–37. [cit. 13. 1. 2024]. Dostupné z: https://www.novabotanika.eu/Slechteni_rostlin.html
 34. Pekárková, E. (2004). *Nejnovější směry ve šlechtění zelenin (1)*. [online] Živa 0044-4812, 52(6):259–261. [cit. 24. 12. 2023]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2004-6/nejnovejsi-smery-ve-slechteni-zelenin-1.html>
 35. Pekárková, E. (2005). *Nejnovější směry ve šlechtění zelenin (5). Cibulové zeleniny*. [online] Živa 0044-4812, 53(4):162–164. [cit. 24. 12. 2024]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2005-4/nejnovejsi-smery-ve-slechteni-zelenin-5-cibulove-zeleniny.html>
 36. Pike, L. M. (1986). 10 Onion Breeding. In: Bassett, M. J. (Eds.). *Breeding Vegetable Crops*. První vydání. AVI PUBLISHING COMPANY, INC. Westport. pp. 357–394. ISBN: 0-87055-499-9
 37. Průša, R. (1997). *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Univerzita Karlova. Praha. ISBN 80-238-0940-7.
 38. Řepková, J. (2013). *Genetika rostlin* [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. Elportál.. [cit. 27. 11. 2023]. ISBN 978-80-210-6408-9. ISSN 1802-128X. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1119341>
 39. Sato, Y. (1998). PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96:367–370. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220050750>
-

-
40. Scobeyeva, V. A., Omelchenko, D. O., Dyakov, L. M., Konovalov, A. S., Speranskaya, A. S., Krinitsina, A. A. (2018). Comparison of Some Plant DNA Extraction Methods. *Russian Journal of Genetics*. 54(5):576–586
41. Sharma, P. K., Bağcı, A., Preeti. (2023). Development of Onion Hybrids using Cytoplasmic Genetic Male Sterility. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics* 9(1):64–77
42. Schweisguth, B. (1973). Étude d'un nouveau type de stérilité male chez l'oignon, *Allium cepa* L. *Ann. Amélior. Plant.* 23:221–223.
43. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (2005). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-3841-1.
44. Tiwari, S., Tomar, R. S., Tripathi, M. K., Ahuja, A. (2017). Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation. *Indian Res. J. Genet. & Biotech.* 9(4):478–485.
45. Trojánek, Z. (2013). *Izolace dna z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci*. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
46. Večeřová, E. (2010). *Využití rostlin z čeledi česnekovitých ve výživě*. Bakalářská práce, Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta
47. Vlček, F., Janýška, A., Lužný, J., Moravec, J., Toul, V. (1966). *Cibulové zeleniny: pěstování a kuchyňská úprava*. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství). Praha: Státní zemědělské nakladatelství
48. Vyhnánek, T. (2019). *Male Sterility*. [online] Plant Genetics [cit. 2.3. 2024]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=8750
-

Seznam obrázků

Obrázek 3.1: Části cibule využité pro izolaci DNA.....	24
Obrázek 3.2: Pěstování rostlin cibule kuchyňské	33
Obrázek 4.1: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcPMS1	41
Obrázek 4.2: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1	42
Obrázek 4.3: Detekce CMS – marker <i>cob</i>	43
Obrázek 4.4: Detekce CMS – marker <i>orfA501</i>	44
Obrázek 4.5: Detekce CMS – marker <i>orf725</i>	44
Obrázek 4.6: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C1A – C1H.....	45
Obrázek 4.7: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C1I – C1P	46
Obrázek 4.8: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C2A – C2H.....	46
Obrázek 4.9: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C2I – C2P	47
Obrázek 4.10: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C3A – C3H.....	47
Obrázek 4.11: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C3I – C3P	48
Obrázek 4.12: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C4A – C4H.....	48
Obrázek 4.13: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C4I – C4P	49
Obrázek 4.14: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C5A – C5H.....	49
Obrázek 4.15: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C5I – C5P	50
Obrázek 4.16: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C6A – C6H.....	50
Obrázek 4.17: Detekce lokusu <i>Ms</i> markerem AcSKP1 – vzorky C6I – C6P	51
Obrázek 4.18: Detekce CMS – linie C1 marker <i>cob</i>	52
Obrázek 4.19: Detekce CMS – linie C1 marker <i>orfA501</i>	52
Obrázek 4.20: Detekce CMS – linie C2 marker <i>cob</i>	53
Obrázek 4.21: Detekce CMS – linie C2 marker <i>orfA501</i>	53
Obrázek 4.22: Detekce CMS – linie C3 marker <i>cob</i>	53
Obrázek 4.23: Detekce CMS – linie C3 marker <i>orfA501</i>	54
Obrázek 4.24: Detekce CMS – linie C4 marker <i>cob</i>	54
Obrázek 4.25: Detekce CMS – linie C4 marker <i>orfA501</i>	54
Obrázek 4.26: Detekce CMS – linie C5 marker <i>cob</i>	55
Obrázek 4.27: Detekce CMS – linie C5 marker <i>orfA501</i>	55
Obrázek 4.28: Detekce CMS – linie C6 marker <i>cob</i>	56
Obrázek 4.29: Detekce CMS – linie C6 marker <i>orfA501</i>	56

Seznam tabulek

Tabulka 3.1: Typy vzorků pro extrakci DNA	23
Tabulka 3.2: Přehled vzorků určených pro izolaci DNA	25
Tabulka 3.3: Seznam vzorků pro optimalizaci PCR	33
Tabulka 3.4: Použité primery pro PCR	36
Tabulka 4.1: Výsledky izolace DNA pomocí MagCore a CTAB-PVP	39
Tabulka 4.2: Výsledky izolace DNA pomocí kitů	39
Tabulka 4.3: Shrnutí výsledků hlavních vzorků	58

Seznam použitých zkratek

AFLP	amplified fragment length polymorphism (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů)
bp	bázové páry
CMS	cytoplasmatic male sterility (cytoplazmatická samčí sterilita)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTAB	cetyl trimethylamonium bromid
DArT	diversity arrays technology (technologie diverzních polí)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
MAS	marker assisted selection (selekce pomocí markerů)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězcová reakce)
RFLP	fragment length polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
SDS	dodecylsulfát sodný
SNP	single-nucleotide polymorphism (polymorfismus jednonukleotidů)
SSR	simple sequence repeats (opakující se jednoduché sekvence)
TBE	tris-borát-EDTA
TE	Tris/EDTA
UV	ultrafialové záření
V	volt
