

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Izolace DNA třešně (*Prunus avium* L.)

Bakalářská práce

Autorka práce: Bc. Kateřina Hřebcová

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Izolace DNA třešně (*Prunus avium* L.)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D., za odborné vedení, rady, pomoc a trpělivost. Stejně tak chci poděkovat za trpělivost a podporu všem osobám dotčeným mým studiem, tedy především mé milé rodině.

Izolace DNA třešně (*Prunus avium* L.)

Souhrn

Základním a zásadním krokem pro všechny molekulárně-biologické studie a analýzy je izolace kvalitní DNA v dostatečném množství a čistotě. Proces její extrakce je u rostlinného materiálu komplikován přítomností látek, jako jsou např. polyfenoly, polysacharidy, proteiny nebo jiné metabolity, které při současné extrakci s nukleovými kyselinami mohou působit jako inhibitory PCR a vzorky pro další analýzy v podstatě znehodnotit.

Cílem této práce bylo zmapovat používané metody izolace rostlinné DNA, metody izolace DNA třešně, a v experimentální části porovnat výsledky vybraných metod izolace rostlinné DNA z hlediska kvantity a kvality získané DNA. DNA byla izolována z různých tkání druhu *Prunus avium* L., konkrétně z čerstvých listů, pupenů a zmrazených embryí několika odrůd. Původním záměrem bylo porovnat výsledky získané za pomoci dvou komerčních extrakčních kitů (DNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen a GeneElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit firmy Sigma Aldrich). První z kitů byl nahrazen kitem pro rychlé použití DEP-25 DNA Extraction Kit firmy Top-Bio a zařazen byl též klasický protokol extrakce DNA metodou CTAB, a to ve dvou variantách bez zařazení RNázy a se zařazením RNázy do protokolu.

Získané výsledky ukázaly statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými použitými metodami, a to jak z hlediska kvality tak i kvantity DNA. Předpoklad, jehož podkladem byly i literární studie, že komerční kity pro izolaci rostlinné DNA nevykazují vždy relevantní výsledky, nebyl přesvědčivě potvrzen. Klasický protokol metody CTAB pak potvrdil předpoklad získání DNA v přijatelné kvalitě i kvantitě pouze u některých tkání. Výsledky měření spektrofotometrií byly podpořeny analýzami PCR (polymerázová řetězová reakce) provedenými se získanými vzorky DNA a jsou po statistickém vyhodnocení předmětem diskuse.

Klíčová slova: třešeň, *Prunus avium* L., extrakce DNA, CTAB, extrakční kity

DNA extraction of sweet cherry (*Prunus avium* L.)

Summary

Isolation of high quality DNA in satisfactory yield and purity is a fundamental and essential step for all molecular-biological studies and analyses. The process of its extraction can be complicated by many of materials like are polyphenols, polysaccharides, proteins and other metabolites that can be co-isolated with nucleic acids and can act as inhibitors of PCR and cause deterioration of samples for further analyses.

In this thesis, mostly used methods of plant DNA isolation were mapped, and, in experimental part, results, regarded to the yield and purity, of selected plant DNA isolation methods were compared. DNA was obtained from various tissues of *Prunus avium* L. species, namely from fresh leaves, buds and from frozen embryos of several varieties. Comparison of the two commercial isolation kits (DNeasy Plant Mini Kit by Qiagen and GeneElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma Aldrich) was the original intention. The first of the kits was replaced by simple and quick DEP-25 DNA Extraction Kit, Top-Bio and the experiment was extended with CTAB DNA isolation protocol, both with and without application of RNase into the protocol.

The results obtained proved quite significant differences between the methods used, both in yield and purity. The original assumption, supported by several studies, that commercial kits not always gain relevant results, regarded to ability to provide pure DNA, was not accurately proven, the assumption that the CTAB protocol can gain satisfactory results according to the DNA yield and purity was proved only with some tissues. The results of the spectrophotometry were supported with polymerase chain reaction (PCR) analyses conducted with the isolated DNA samples and after statistical evaluation were discussed.

Keywords: sweet cherry, *Prunus avium* L., DNA extraction, CTAB, extraction kits

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Teoretická část - literární přehled	10
3.1 Prunus L.....	10
3.1.1 Taxonomické zařazení.....	10
3.1.2 Charakteristika rodu.....	10
3.1.3 <i>Prunus avium</i> L.....	11
3.1.4 Hospodářský význam třešní	12
3.1.5 Biologicky aktivní látky obsažené v pletivech <i>Prunus avium</i> L.....	13
3.2 Rostlinná DNA a principy její extrakce	14
3.2.1 DNA a její struktura	14
3.2.2 Princip a proces extrakce DNA	15
3.3 Metody analýzy DNA.....	17
3.3.1 Měření kvantity a kvality DNA UV spektrofotometrií	17
3.3.2 Elektroforéza	17
3.3.3 PCR – polymerase chain reaction.....	18
3.4 Metody extrakce DNA	20
3.4.1 Extrakce fenol-chloroformová a její modifikace	21
3.4.2 Adsorpce na silikát	22
3.4.3 Extrakce DNA s využitím magnetických částic	23
3.4.4 Komerční kity	24
3.5 Metody extrakce DNA třešně (<i>Prunus avium</i> L.).....	25
3.5.1 Výběr metod vhodných pro extrakci DNA třešně	27
4 Experimentální část	28
4.1 Materiál a metody	28
4.1.1 Materiál.....	28
4.1.1.1 Rostlinný materiál	28
4.1.1.2 Chemikálie	28
4.1.1.3 Přístroje a pomůcky.....	29
4.1.2 Metody.....	30
4.1.2.1 Příprava rostlinného materiálu	30
4.1.2.2 Extrakce kitem GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)...	30
4.1.2.3 Extrakce kitem DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio).....	31
4.1.2.4 Extrakce pomocí protokolu CTAB.....	31
4.1.2.5 Extrakce pomocí protokolu CTAB s přidanou RNázou	32

4.1.2.6	Podmínky PCR.....	32
4.1.2.7	Elektroforéza	33
4.1.2.8	Statistické vyhodnocení.....	33
4.2	Výsledky	33
4.2.1	Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich	34
4.2.2	Výsledky izolace kitem Top-Bio.....	35
4.2.3	Výsledky izolace dle protokolu CTAB	36
4.2.4	Výsledky izolace dle protokolu CTAB se zařazením RNázy	38
4.2.5	Statistické vyhodnocení výsledků	39
4.2.5.1	Výsledky koncentrace získané DNA.....	39
4.2.5.2	Výsledky čistoty získané DNA (absorbance A260/280)	42
4.2.5.3	Porovnání výsledků jednotlivých metod	43
5	Diskuse.....	46
6	Závěr	49
7	Použitá literatura.....	50
8	Internetové zdroje	53
9	Seznam obrázků a tabulek	54
9.1	Seznam příloh	54
10	Přílohy.....	56

1 Úvod

Třešeň obecná (*Prunus avium* L.) je v mírném pásmu rozšířena buď jako divoce rostoucí strom, jehož hospodářské využití tkví zejména v použití jako podnože pro další pěstované kulturní druhy rodu *Prunus*, nebo ve svých nespočetných odrůdách jako strom pěstovaný především pro sklizeň ovoce – třešní, které má různorodé použití buď jako ovoce pro přímý konzum nebo pro další zpracování v potravinářském průmyslu. Světová produkce třešní byla v letech 2013-2014 2 294 455 tun. Největším producentem bylo Turecko (494 325 t), na 2. místě USA (301 205 t) na 3. místě Írán (200 000 t), na 4. Itálie (131 175 t), na 5. místě Uzbekistán (100 000 t). V České republice bylo v tomto období vyprodukováno 16 343 tun (FAO, 2014).

Třešně jsou ovoce velmi oblíbené pro své chuťové vlastnosti i výživové hodnoty, jsou vynikajícím zdrojem živin a fytochemických látek, obsahují polyfenoly, jako např. hydroxycinamáty, flavonoidy, prokyanidiny nebo anthokyany. Mnohé z těchto látek jsou předmětem výzkumu pro své předpokládané antioxidační účinky.

Hlubší a stále dokonalejší poznání jakéhokoliv rostlinného či živočišného druhu je v dnešní době nemyslitelné, nebude-li prováděno na molekulárně-biologické úrovni. K tomuto účelu a k analýzám na této úrovni je nezbytně nutné mít možnost a prostředky získat z příslušného druhu genetický materiál – nukleové kyseliny, konkrétně DNA, kyselinu deoxyribonukleovou, a to v dostatečné kvantitě a kvalitě, tedy v dostatečné koncentraci a čistotě. Úroveň dostatečnosti je samozřejmě posuzována podle toho, k jakým dalším analýzám je nutno vzorky získat. Do současné doby bylo vyvinuto mnoho postupů a metod izolace, cílem každé z nich je získat stále kvalitnější výsledky – tedy co nejčistší DNA v co nejvyšším množství. Používané metody lze rozdělit jednak na tradiční protokoly a jednak na komerční kity. Ty byly vyvinuty především pro urychlení a zjednodušení celého procesu. Jejich nevýhodou je především vyšší cena a často i nepříliš velká spolehlivost a kvalita (Akkurt, 2012). Přehled používaných metod je předmětem literární části této práce, v části experimentální byly vybrány tři metody izolace (tradiční protokol CTAB a dva komerční kity) a výsledky statisticky vyhodnoceny.

2 Cíl práce

Prvním cílem této bakalářské práce bylo zaprvé v literární části zmapovat dosud používané metody izolace rostlinné DNA, pokusit se zmapovat přímo izolaci DNA u druhu *Prunus avium* L., a dokumentovat jejich výsledky z hlediska dosahované kvality a kvantity.

Druhým cílem původně bylo v experimentální části provést srovnání výsledků izolace DNA u druhu *Prunus avium* L. za pomoci dvou komerčně dostupných extrakčních kitů (DNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen a GeneElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit firmy Sigma Aldrich). Vzhledem k momentální nedostupnosti prvního z kitů byl tento nahrazen kitem pro rychlé použití DEP-25 DNA Extraction Kit firmy Top-Bio. Experimenty byly průběhu rozšířeny o izolaci DNA za pomoci klasického protokolu CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid). Naměřené výsledky statisticky vyhodnotit s použitím t-testů a analýzy rozptylu. Konečné výsledky pak diskutovat z hlediska kvality, kvantity a použitelnosti získaných vzorků.

3 Teoretická část - literární přehled

3.1 Prunus L.

3.1.1 Taxonomické zařazení

říše *Plantae* – rostliny

oddělení *Magnoliophyta* - rostliny krytosemenné

třída *Rosopsida* - vyšší dvouděložné rostliny

řád *Rosales* – růžotvaré

čeleď *Rosaceae* – růžovité

podčeleď *Amygdaloideae*

(BioLib, 2016)

3.1.2 Charakteristika rodu

Jak uvádí Kirschner (2002), rod *Prunus* L. (slivoň, střemcha, mandloň, mahalebka, bobkovišeň, třešeň, meruňka, broskvoň) pravděpodobně pochází ze západní Asie. Nacházíme jej především v mírném pásu severní polokoule, v tropických oblastech je rozšířen jen zřídka. Areál rodu *Prunus* dnes zahrnuje téměř celou Evropu, ale i severní Afriku, Blízký i Dálný Východ, jižní Austrálii a Nový Zéland, a mírné pásmo amerického kontinentu (Basanta et al., 2014). Do tohoto rodu čítajícího asi 230 druhů, patří velké množství zemědělsky významných druhů ovocných stromů. Ve střední Evropě se vyskytuje 13 využívaných kulturních druhů, ale pouhá polovina z nich je původní.

Do rodu *Prunus* L. řadíme opadavé, vzácně vždyzelené, stromy, keře nebo polokeře s kořenovými výmladky (Kirschner, 2002). Řapíkaté listy jsou střídavé, celistvé, pilovité, vroubkované, zřídka celokrajné nebo laločnaté. Pětčetné oboupohlavné květy vyrůstající na brachyblastech jsou buď samostatné nebo uspořádané v okolících, chocholících či hroznech. Kališní lístky za květu většinou opadávají (pouze u *P. serotina* jsou vytrvalé). Oválné až téměř okrouhlé korunní lístky mají bílou nebo růžovou barvu. Na dně miskovité až lahvicovité češule se nachází jeden svrchní semeník se dvěma vajíčky a jedinou prodlouženou čnělkou.

Charakteristickými plody jsou peckovice s dřevnatým endokarpem (Kirschner, 2002). Tento dužnatý plod, peckovice, má oplodí rozlišené na blanitý exokarp, dužnatý a šťavnatý mezokarp a tvrdý, signifikovaný endokarp běžně nazývaný pecka. Jedlou částí plodu je mezokarp. Komerčně se nejvíce využívá plodů broskví a nektarinek náležících ke druhu *Prunus persica* L., švestek druhu *Prunus domestica* L. a *Prunus salicina* Lindl., višňi druhu *Prunus cerasus* L., meruněk druhu *Prunus armeniaca* L. a třešňi druhu *Prunus avium* L.



Obrázek 1: *Prunus avium* L., habitus v květu
zdroj:

http://www.hsrs.cz/mapserv/czu_dhtml/fo_to_pz/orig/pruavi_habitus_v_kvetu.jpg

3.1.3 *Prunus avium* L.

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L., syn. *Cerasus avium* (L.) Moench., *Prunus cerasus* L. (var.) *avium* L., *Prunus avium* (L.) L. a *Cerasus nigra* Mill.) je na našem území původní. Jedná se o velmi variabilní strom, může být vysoký 3 – 35 m. V rámci *P. avium* jsou rozlišovány tři výrazné skupiny, které jsou hodnoceny jako odrůdy či poddruhy. Jedná se o planou maloplodou (plody do 10 mm) varietu *avium* (ptáčnici, třešeň ptačí pravou, třešeň ptačí

planou), dále o pěstované či zplanělé velkoplodé (plody nad 10 mm): varietu *juliana* (L.) Pojark. (srdcovku) a varietu *duracina* (L.) Pojark. (chrupku), (Chrtek, 1992). Vyskytuje se roztroušeně po celém území České republiky (Chrtek, 1992; Kirschner, 2002), především v termofytiku a nižších polohách mezofytika). V České republice je v četných kultivarech pěstována po celém území, nacházejí se zde ucelené třešňové produkční oblasti, hlavní jsou ve středních Čechách, v Českém středohoří a na jižní Moravě (Chrtek, 1992; Kirschner, 2002).



Obrázek 2: *Prunus avium* L., květy
zdroj:

http://www.hsrs.cz/mapserv/czu_dhtml/foto_pz/orig/pruavi_kvet.jpg



Obrázek 3: *Prunus avium* L., plody
zdroj:

<http://botany.cz/foto/prunusavherb3.jpg>

3.1.4 Hospodářský význam třešní

Třešně jsou hospodářsky významné především jako ovocné stromy, poskytující velmi oblíbené chutné plody, bohaté na mnoho pro lidský organismus prospěšných látek. Pecky planě rostoucích druhů jsou využívány jako semena, semenáče pak ve šlechtitelství jako podnože pro mnohé ušlechtilé odrůdy třešní, višní a sladkovišní. Plody třešně jsou vhodné nejen pro přímý konzum, ale i pro další potravinářské a konzervářské zpracování, oblíbené jsou zejména ve formě kompotů, džemů, ale používají se i k výrobě destilátů a likérů. Třešňové dřevo má rovněž různorodé využití, používá se např. při uzení masa (stejně jako dřevo ostatních stromů rodu *Prunus*), neboť dodává konečnému produktu velmi příjemnou chuť. Pro svojí velmi pěknou červenavou barvu a strukturu je využíváno i k výrobě drobnějšího nábytku.

3.1.5 Biologicky aktivní látky obsažené v pletivech *Prunus avium* L.

Jak již bylo řečeno, plody třešně jsou bohatým zdrojem různorodých bioaktivních látek. Obsahují malé množství karbohydrátů, především jednoduchých cukrů, jako je glukóza, fruktóza, sacharóza a sorbitol (D-glucitol), dále organické kyseliny, jako je kyselina jablečná, kyselina citronová, kyselina jantarová, kyselina mléčná a kyselina šťavelová (Ballistreri et al., 2013). Jsou též významným zdrojem vitamínů, především vitamínu C (Schmitz-Eiberger et Blanke, 2012), a důležitých minerálů, především draslíku, fosforu, vápníku a hořčíku (Yigit et al., 2009).

Plody třešní také obsahují některé fenolické sloučeniny jako fenolové kyseliny (hydroxycinamáty) a flavonoidy (anthokyaniny, flavan-3-oly a flavonoly), u kterých jsou předpokládány významné antioxidační účinky (Ballistreri et al., 2013).

Díky vysokému obsahu těchto sloučenin je u třešní předpokládán příznivý efekt zejména v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, prevenci rakoviny či jiných chorob způsobených oxidativním stresem. V posledních letech byl také v extraktech plodů pozorován protirakovinný efekt zejména ve spojení s fenolickými sloučeninami (Serra et al., 2011).

Bastos et al. (2014) naměřili signifikantní množství zdraví prospěšných látek v plodech a stopkách třešní (které jsou tradičně využívány i v lidovém léčitelství), látek, které vykazovaly protinádorový potenciál (u buněčných linií karcinomu tlustého střeva).

Z výše uvedeného je možno odvodit, že další studium druhu *Prunus avium* L. může přinést mnohé zajímavé výsledky. Aby bylo možno uvedený (nejen) rostlinný druh podrobit zkoumání z nejrůznějších úhlů pohledu, ať už se jedná o výzkum z hlediska šlechtitelství, určení genových zdrojů, identifikace druhů, jednotlivých kultivarů či ušlechtilých odrůd, určení rodičovských jedinců, analýzy rodokmenů, genomového mapování či genové selekce, je nezbytně nutné disponovat kvalitním vstupním materiálem. Nejdůležitějším bodem dalších studií v rámci druhu je tedy extrakce genomové DNA v požadovaném množství a čistotě.

3.2 Rostlinná DNA a principy její extrakce

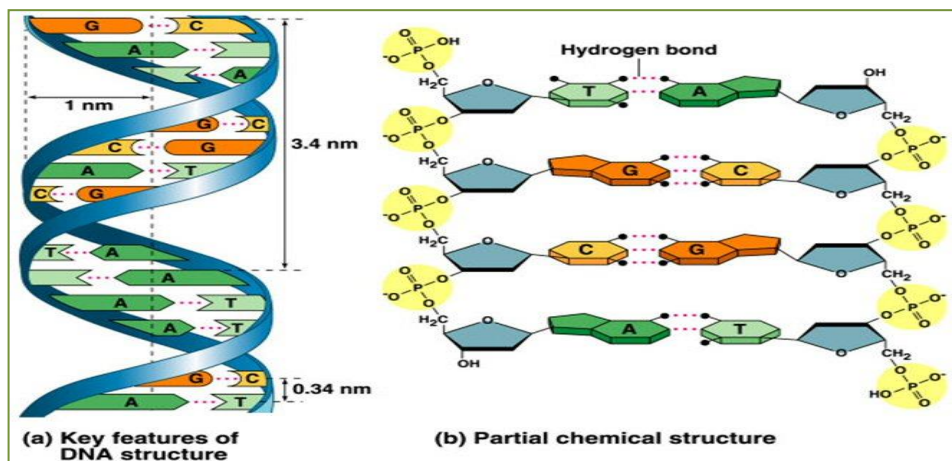
3.2.1 DNA a její struktura

Když v roce 1953 James Watson a Francis Crick navrhli model dvoušroubovice DNA, začala zcela nová éra vývoje biologie, biochemie a na ně navazujících oborů od molekulární biologie až po genové inženýrství. Důležitými výchozími body pro jejich objev byly jednak poznatky Erwina Chargaffa o poměru purinových a pyrimidinových fází v DNA, jednak práce Rosalindy Franklinové a Maurice Wilkinse a jejich fotografie z difrakce rentgenových paprsků procházejících krystalem čisté DNA (Štípek, 1998). Watson s Crickem za svůj objev obdrželi v roce 1962 Nobelovu cenu.

Strukturu DNA můžeme rozdělit na primární a sekundární. Primární strukturu DNA tvoří mononukleotidy složené z pentózy (v případě DNA se jedná o 2'-deoxy- β -D-ribofuranózu neboli deoxyribózu), fosfátového zbytku (fosfátu) a dusíkaté báze, odvozené buď od pyrimidinu (cytosin, thymin) nebo od purinu (adenin, guanin) (Štípek, 1998).

Sekundární strukturou rozumíme dvoušroubovicovou strukturu řetězců DNA. Pentózofosfátové páteře obou řetězců se otáčejí po zevním povrchu dvoušroubovice (helixu), zatímco báze směřují k její ose. Ve shodě s Chargaffovými pravidly se adenin páruje dvěma vodíkovými můstky s thyminem (A=T) a guanin třemi vodíkovými můstky s cytosinem (G \equiv T).

Plochy bází jsou ve Watsonově–Crickově modelu DNA kolmé na osu dvoušroubovice. Jsou od sebe vzdáleny 0,34 nm. Sousední páry bází se vážou hydrofobními interakcemi, což zesiluje vazbu řetězců DNA. Jedna otáčka dvoušroubovice obsahuje deset párů bází, měří tedy 3,4 nm (periodicita hustoty atomů podle difrakce rtg paprsků, jak ji ukázala práce Franklinové s Wilkinsem). Průměr dvoušroubovice je 2 nm (Štípek, 1998).



Obrázek 4: Struktura DNA

zdroj: <https://www.tes.com/lessons/GQEcsjrflYcF1w/dna-structure-and-function>

DNA jako nositelka genetické informace je u eukaryotních organismů umístěna především v jádře, v menší míře pak v organelách, především v mitochondriích a u rostlin také v chloroplastech. Zatímco jaderná (gDNA) má lineární strukturu a geny v ní kódované vykazují mendelistickou dědičnost, DNA mitochondriální (mtDNA) a chloroplastová (cpDNA) mají strukturu cirkulární a vlastnosti v nich kódované vykazují poměry odlišné od mendelistických zákonů. Obě tyto organely jsou specializované na kódování enzymů dýchacího řetězce a fotosyntézy, molekul RNA a řady dalších vlastností, např. u mitochondrií geny pro cytoplazmatickou pylovou sterilitu nebo u chloroplastů geny pro fotosyntézu, geny odolnosti vůči herbicidům atd. Mitochondriální DNA u rostlin tvoří 1 – 2 % celkové DNA buňky, chloroplastová DNA asi 1 – 20 %.

3.2.2 Princip a proces extrakce DNA

Princip izolace deoxyribonukleové kyseliny vychází z jejích chemických vlastností. Fosfátové estery jsou silné kyseliny a chovají se jako anionty při neutrálním pH; DNA je snadno precipitována alkoholem; báze jsou jen slabě bazické a bez náboje; vodíkové vazby mezi skupinami $-NH_2$ a $-OH$ jsou stabilní od pH 4 do pH 9; nukleové kyseliny mají maximum absorpce UV světla při 260 nm, přičemž jednovláknová DNA dává o 20 - 30% větší absorpenci než dvouvláknová; DNA je mimořádně stabilní molekula (Průša, 1997).

Z tohoto principu vychází i obecný postup při získání DNA z tkání. V případě tkání rostlinných je tento proces komplikován několika faktory – na rozdíl od buňky živočišné má

rostlinná buňka pevnou buněčnou stěnu, kterou je nutné pečlivě rozrušit, a obsahuje mnohé vnitrobuněčné látky, které mohou s izolovanou DNA interferovat (Zhang et al., 2013). Mnoho aromatických, léčivých rostlin a dřevin obsahuje vysokou hladinu sekundárních metabolitů, jako jsou alkaloidy, flavonoidy, polyfenoly, polysacharidy, gummy (Shepherd et al., 2002; Vural, 2009). Tyto komplexní látky vždy komplikují izolaci DNA, mohou být s DNA spoluizolovány, vzorky DNA obarvit, znesnadňovat práci s pipetami apod. (Zhang et al., 2013).

Obecně je tedy nutné účinně eliminovat látky, které by mohly proces izolace DNA negativně ovlivňovat. Mezi tři hlavní látky, které působí problémy, patří polysacharidy, polyfenoly a proteiny a jejich schopnost vytvářet komplexy s nukleovými kyselinami (Zhang et al., 2013). Proces izolace DNA z rostlinné buňky spočívá v odstranění polysacharidů a polyfenolických sloučenin, následné deproteinizaci, srážení a purifikaci DNA.

Proces izolace začíná mechanickým rozrušením buněk rostlinné tkáně (z čerstvého, začerstva zmrazeného či sušeného biologického materiálu) v prostředí tekutého dusíku, rostlinná tkáň je dehydrována. Zmrazenou tkáň je nutno důkladně rozmělnit, ideálně v třecí misce (alternativně možno přímo ve zkumavce), a dbát na to, aby byla po celou dobu této procedury zmrazená, aby nedošlo k degradaci DNA. Dalším krokem je narušení buněčných membrán za pomoci detergentů, které se liší v závislosti na použité metodě. V úvahu připadá použití buď SDS (sodiumdodecylsulfát) nebo CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid). Do extrakčního pufru se přidává EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové) jako ochrana před působením endonukleáz a zároveň jako chelatační činidlo. K deproteinizaci je možno použít organické sloučeniny jako fenol, chloroform, izopropanol, opět dle použitého protokolu extrakce. Následuje promytí získané DNA ethanolem a v případě potřeby ještě odstranění RNA za pomoci RNázy. Jak experimentálně ověřili Zhang et al. (2013), proces extrakce je možno opakovat několikrát (konkrétně v této studii 4x recyklovaná CTAB extrakce), čímž získali DNA v dobré kvalitě a vysoké koncentraci.

3.3 Metody analýzy DNA

3.3.1 Měření kvantity a kvality DNA UV spektrofotometrií

Získané vzorky můžeme uchovat při teplotách pod $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ k dalšímu zpracování, nebo rovnou přistoupit k ověření kvality a kvantity za pomoci UV spektrofotometrie. Touto metodou získáme údaje jednak o koncentraci získané DNA, jednak o její čistotě.

UV spektrofotometr využívá schopnosti látek absorbovat světlo při různých vlnových délkách. Čistotu DNA zjišťujeme změřením poměru absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm, resp. poměru 260 a 230 nm. Hodnoty poměru 260/280 by se pro DNA měly pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9 (hodnota 1,8 značí čistou DNA). Hodnoty nižší než 1,7 značí zpravidla kontaminaci vzorků zejména proteiny, hodnoty vyšší než 1,9 mohou značit přítomnost RNA ve vzorku (Varma et al., 2007). Hodnoty poměru 260/230 by se měly pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0 (2,2), hodnoty nižší jsou zpravidla způsobeny přítomností reziduí organických látek, mohou to být např. karbohydráty – často právě v případě rostlinného materiálu, fenoly použité v průběhu extrakce, guanidin, glykogen a podobně. Hodnoty vyšší mohou znamenat použití nevhodného roztoku pro „slepý“ vzorek – ten by měl odpovídat roztoku v TE pufru (Wilfinger et al., 1997).

3.3.2 Elektroforéza

Jako jedna z nejpraktičtějších a nejvýkonnějších metod dělení makromolekul se jeví gelová elektroforéza. Je založena na principu pohybu makromolekul (v tomto případě fragmentů DNA) v porézním gelu. Díky svému zápornému náboji se molekuly DNA v gelu pohybují směrem ke kladné elektrodě a podle své velikosti procházejí „sítím“ gelu. Hustota tohoto „síta“ se volí prostřednictvím koncentrace gelu závislé na předpokládané velikosti fragmentů DNA.

Nejčastěji se užívají dva typy gelu a elektroforézy:

- agarózová gelová elektroforéza, a to buď horizontální, nebo vertikální. Tento typ je vhodný pro fragmenty o velikosti v rozmezí 10 bp – 20 kbp. Dle předpokládané velikosti

fragmentů se volí koncentrace gelu (od 0,4% až po 5% roztok). Pro srovnání a kalibraci se ke zkoumaným vzorkům přidává směs fragmentů DNA o známé velikosti. Vzorky se na start nanášejí po obarvení barvou viditelného spektra (např. bromfenolová modř). Rozdělené frakce je možné buď přenést na speciální membrány (fólie) tzv. blotováním a podrobit hybridizaci nebo pomocí fluorescenčních barviv např. ethidiumbromidem interkalací mezi nukleotidy vizualizovat na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací (Průša, 1997).

- polyakrylamidová gelová elektroforéza je druhým nejčastěji používaným způsobem. Elektroforetickým médiem je zde polyakrylamidový gel (denaturační, obvykle s ureou, nebo nedenaturační). Jedná se o vertikální elektroforézu. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru (TAE – Tris-báze, acetát, EDTA) pomocí volných radikálů. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných fragmentů DNA od 3,5% (fragmenty 1 - 2 kbp) až po 20% gely pro separaci malých fragmentů 10 - 100 bp (Průša, 1997).

3.3.3 PCR – polymerase chain reaction

Vzhledem k velké délce vlákna DNA dochází při izolaci k jeho rozdělení na menší fragmenty náhodné délky. Při použití restričních endonukleáz, což byla metoda 70. let minulého století, bylo možno získat fragmenty délky předem definované, ale stále to neřešilo problém, kterak získat velké množství čisté DNA pro další analýzy.

S velmi jednoduchým a elegantním řešením přišel v roce 1983 Kary Mullis, který za svůj objev PCR o 10 let později obdržel Nobelovu cenu (1993). Metoda byla uvedena do praxe v 80. letech 20. stol. a vnesla do výzkumů v oblasti molekulární biologie takřka revoluci (Lisby, 1999).

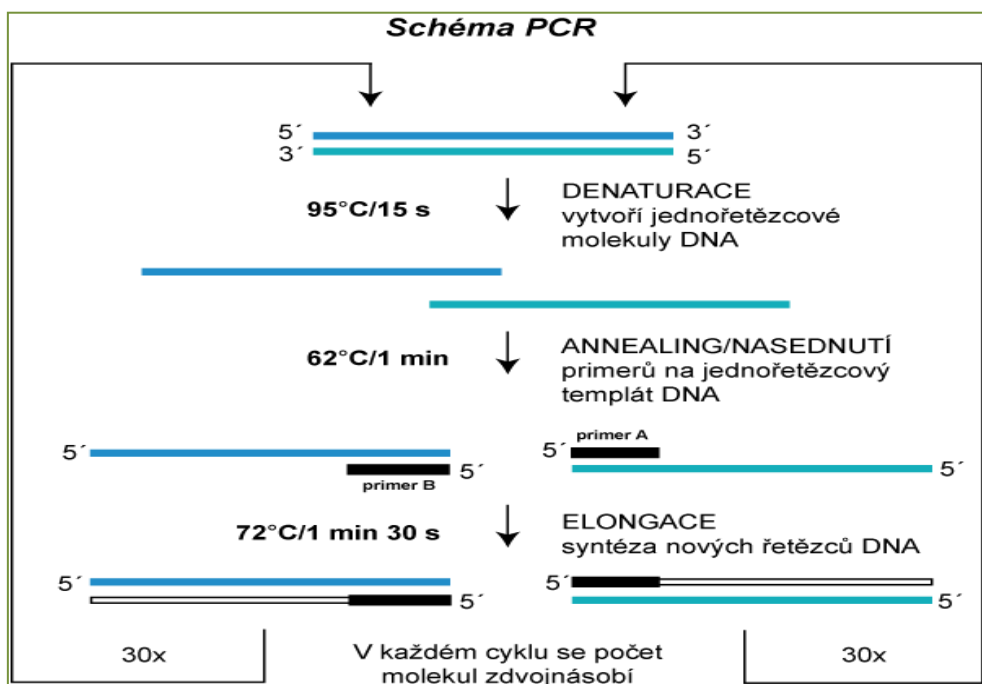
Princip PCR je jednoduchý – spočívá v amplifikaci (namnožení) libovolně malého úseku vlákna DNA. Původní dvouvláknová DNA (dsDNA) je za pomoci vysoké teploty (rozmezí 92 - 98 °C) denaturována na dvě jednovláknové DNA (ssDNA), doba denaturace se různí podle velikosti fragmentů, bývá v desítkách sekund. V druhém kroku následuje za snížené teploty (50 - 60 °C) připojení nebo nasednutí primerů (tzv. annealing) na tyto jednovláknové templátové DNA. Doba se opět různí dle délky primerů, od desítek sekund po minuty. Ve

třetím, posledním kroku se syntetizují nové řetězce (fáze elongace). Jedná se o extenzi připojených primerů DNA polymerázou, která musí být termostabilní. V této fázi jsou připojovány jednotlivé deoxynukleotidy ve směru 5'→3'. Teplota je v této fázi dána teplotním optimem použité DNA polymerázy. Celý cyklus se opakuje v průměru 30x, počet opakování závisí na koncentraci výchozí templátové DNA, teoreticky se může opakovat ad infinitum (Mullis, 1990).

Celý proces probíhá v přístroji zvaném thermocycler, který zajišťuje přesně nastavené podmínky pro celou reakci.

Úspěch metody závisí na vhodném výběru DNA polymerázy a primerů. Pokud je předmětem studia neznámý genom, u kterého primery nelze odhadnout, je možno použít specifické metody PCR:

- RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNAs) je metoda založená na PCR, při které se používají velmi krátké primery (dlouhé okolo deseti nukleotidů) a nízké teploty zchlazení. Tyto primery se dají univerzálně použít pro prakticky jakýkoliv organismus.
- AFLP-PCR (amplified fragment length polymorphisms) je metoda využívající PCR a štěpení restričními enzymy. Výhodou této metody je, že dokáže rychle vygenerovat velké množství polymorfních markerů i u druhů, u kterých nemáme žádnou předchozí genetickou informaci. Na rozdíl od RAPD tato metoda vyniká vysokou mírou opakovatelnosti. Nevýhodou proti RAPD však je vyšší cena i technická náročnost (Powell et al., 1996).



Obrázek 5: Schéma principu PCR

zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/59/9281.png

3.4 Metody extrakce DNA

Během rychlého vývoje molekulární biologie v posledních desetiletích vyvstala také potřeba vývoje metod extrakce DNA, zejména v případě extrakce DNA z rostlinného materiálu, kde je izolace ztížena přítomností mnoha látek, jako jsou proteiny, polyfenoly, polysacharidy, gumy apod. (Shepherd et al., 2002; Vural, 2009). Navíc se ukazuje, že pro různé, a to dokonce i pro velmi příbuzné druhy, nemusí být dostačující jedna metoda izolace (Xin et Chen, 2012; Zhang et al., 2013).

V současné době existuje několik základních metod extrakce DNA a velké množství jejich modifikací, které jsou buď upraveny pro konkrétní druh, nebo za účelem snížení nákladů jak časových, tak finančních. Populární je použití komerčních kitů, jejichž hlavní výhodou tkví v již připravených reagentech a kolonách, tedy v časové úspoře, nevýhodou však bývá vysoká cena a často i nepřesnost nebo neopakovatelnost výsledků (Akkurt, 2012). Při výběru metody je tedy vždy nutné zvážit, v jakém množství a kvalitě a pro jaké další analýzy extrahovanou DNA potřebujeme.

3.4.1 Extrakce fenol-chloroformová a její modifikace

Klasická fenol-chloroformová metoda extrakce (Sambrook et al., 1989) ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné v pufru (zpravidla obsahuje EDTA, NaCl, Tris-HCl, 2-merkapt ethanol) a odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (v poměru 25:24:1). Chloroform jako organické rozpouštědlo se nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Protřepáváním dochází k mísení fází, při kterém fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, takže po skončení protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze. Po protřepání je roztok odstředěn pro dokonalé oddělení fází. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny a je přenesena do nové čisté zkumavky. U izolace z rostlin je nutné odstranit i polysacharidy extrakcí s CTAB (cetyltrimethylamoniumbromidem) nebo SDS (sodiumdodecylsulfát) – bývají součástí pufru. Nakonec je nutné extrahovat ještě jednou směsí jen chloroformu s izoamylalkoholem (24:1), aby byly odstraněny i stopy fenolu v roztoku.

Z přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného ethanolu nebo izopropanolu, po odstředění se na dně zkumavky objeví mléčně zkalený sediment (pelet). S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin a dávají peletu bílé zbarvení. Soli je pak potřeba vymýt 70% ethanolom. Čisté nukleové kyseliny je možné po odsátí supernatantu rozpustit ve vodě nebo ve vhodném pufru. Protože více než 95 % objemu nukleových kyselin v buňce tvoří RNA, převažuje RNA i v tomto roztoku. Pokud potřebujeme pracovat s čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy.

Existuje mnoho protokolů, kterého z tohoto klasického principu vycházejí, ale byly modifikovány pro různé účely. Některé modifikace vynechávají v protokolu použití fenolu (fenol kvůli své toxicitě vyžaduje zvýšenou pozornost při manipulaci, zejména ve směsi s chloroformem). Thomas et al. (1993) prezentují upravený protokol bez použití fenolu, jako detergent uvádí 3% sarkosyl a přidání PVP (polyvinylpyrrolidon). Lodhi et al. (1994) uvádějí protokol opět bez použití fenolu, jako detergent je použit CTAB. Konečně Lefort et al. (1998)

uvádějí v protokolu užití jak CTAB tak SDS v roli detergentů, spolu s PVPP (polyvinylpolypyrrolidon).

Zajímavé srovnání těchto tří výše citovaných protokolů a zároveň tří komerčních kitů k extrakci DNA z *Vitis vinifera* L. přináší Akkuratova (2012) práce. Z jejích výsledků jednoznačně vyplývá výrazně vyšší kvalita i kvantita DNA izolované klasickým protokolem dle Leforta et al. (1998).

Healey (2014) uvádí zjednodušenou metodu extrakce DNA modifikací původního protokolu CTAB (Doyle et Doyle, 1987), s vynecháním PVP, založenou především na pozmeněné manipulaci, kterou dosáhl výborných výsledků při extrakci DNA z rostlin rodu *Corymbia* a *Coffea brassii*, které se vyznačují velkým množstvím potenciálně kontaminujících látek v pletivech.

3.4.2 Adsorpce na silikát

Další používaná izolační metoda (Todorova et al., 2002) je založena na faktu, že DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí (iontové sloučeniny, které snižují strukturovanost vody; nejčastěji se používá jodid sodný nebo ionty guanidinu) adhezuje na silikátový povrch. K roztoku, obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. Protřepáváním směsi se usnadňuje ulpívání DNA na částice. Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a lze je pak jednoduše odstranit – částice necháme usadit nebo usazení urychlíme centrifugací, odsajeme roztok nad částicemi a propláchneme novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovném odstředění a odsátí roztoku zůstává na částicích adhezerovaná čistá DNA. Tu lze pak z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimi je čistý roztok DNA.

Tato metoda pro svou jednoduchost a nenáročnost slouží jako základ pro protokoly komerčních kitů pro rutinní extrakci DNA.

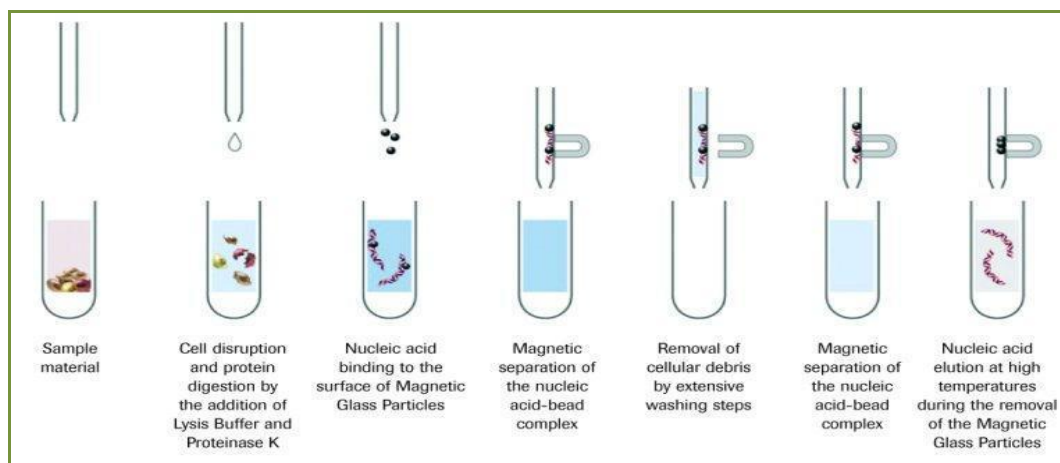
3.4.3 Extrakce DNA s využitím magnetických částic

Moderní metoda využívající vlastností magnetických částic pro biotechnologie. Superparamagnetické částice vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Po jeho odstranění částice magnetické vlastnosti ztrácejí. Magnetické částice pro biologické aplikace jsou tvořeny magnetickým jádrem a ochranným obalem, tvořeným polymerní vrstvou chránící jádro před kontaktem se vzorkem a umožňující úpravu povrchu nosiče za účelem cílené separace. Jak uvádí Pečová et al. (2011), spojením magnetických nosičů s biologicky aktivními látkami lze dosáhnout vlastností, díky kterým je možné tyto látky separovat i ze složitých biologických systémů.

Na specificky upravený povrch magnetického nosiče je takto možno vázat molekuly DNA. Po vazbě těchto molekul dojde k separaci částic s navázanou látkou přiložením magnetického pole, následuje promytí kontaminantů a eluce DNA.

Vuosku et al. (2004) potvrzují možnost využití této metody při izolaci rostlinné DNA za předpokladu přidání PVP do solného extrakčního pufru i do pufru dodaného výrobcem kitu, a dosáhnout tak dobré výtěžnosti a čistoty DNA i z malých objemů vstupního rostlinného materiálu.

Zajímavou metodu kombinující protokol CTAB a modifikovanou metodu purifikace DNA pomocí magnetických částic potažených silikátem představili Xin et Chen (2012). Z osmi druhů (*Cynodondactylon* L., *Populus deltoides* L., *Pinus eldarica* L., *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., *Gossypium hirsutum* L., *Nicotiana tabacum* L. a *Sorghum*) extrahovali DNA ve vysoké koncentraci i čistotě. Metoda se osvědčila jako vysoce spolehlivá, časově i finančně nenáročná.



Obrázek 6: Schéma extrakce DNA s využitím magnetických částic.

Zdroj:

<https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Products/3.8.2.1.1.6/Images/MagNAPurePrinciple.jpg>

3.4.4 Komerční kity

Jak již bylo řečeno, komerční kity využívají k extrakci DNA většinou metodu adsorpce na silikát, ale existují i kity s magnetickými částicemi. Jejich využití je populární pro svou jednoduchost a rychlost, jejich nevýhodou je vysoká cena a nespolehlivost, je-li vyžadována vysoká výnosnost a čistota DNA (Akkurt, 2012).

Pouze pro ilustraci (neboť producentů těchto kitů je nepřehledné množství a jejich produktů ještě více) je zde uvedeno několik výrobců a příklady nabízených kitů a jejich současné ceny:

- **Thermo Fisher Scientific, Inc., USA** (www.thermofisher.com)
 - ✓ ChargeSwitch® gDNA Plant Kit (vhodný pro testování GMO), cena 9410 Kč/96 vzorků
 - ✓ PureLink® Genomic Plant DNA Purification Kit (kit na bázi adsorpce na silikát) cena 5720 Kč/50 vzorků
 - ✓ MagMAX™-96 DNA Multi-Sample Kit (kit na bázi magnetických nosičů), cena 7800 Kč/96 vzorků
- **Sigma-Aldrich, USA** (www.sigmaaldrich.com)
 - ✓ GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (kit na bázi adsorpce na silikát), cena 7965 Kč/70 vzorků

- ✓ Norgen Biotek's Plant/Fungi DNA Isolation Kit (kit pro izolaci gDNA, mtDNA, cpDNA), cena 5508 Kč/50 vzorků
- ✓ Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit (kit pro extrakci a amplifikaci DNA), cena 7182 Kč/100 vzorků
- **Qiagen, Německo** (www.qiagen.com)
 - ✓ DNeasy Plant Mini Kit, (kit na bázi adsorpce na silikát), cena nedostupná
- **Top-Bio, Česká Republika** (www.top-bio.cz)
 - ✓ DEP-25 DNA Extraction Kit (dvousložkový „rychlouk“), cena 390 Kč/100 vzorků
 - ✓ Column DNA Lego Kit (kit na bázi adsorpce na silikát), cena 2200 Kč/200 vzorků

3.5 Metody extrakce DNA třešně (*Prunus avium* L.)

Přestože je třešeň a plody jejích ušlechtilých odrůd velice oblíbeným ovocem, ceněným pro své chuťové vlastnosti a výživové hodnoty (Picariello et al., 2016), existuje jen málo studií zaměřených na její studium z hlediska molekulárně-biologického, resp. přímo na stanovení optimální metody izolace kvalitativně i kvantitativně dostačující DNA.

Mohanty et al. (2001) se věnovali studiu diverzity chloroplastové DNA u divokých populací a některých kultivarů *Prunus avium* L. DNA byla extrahována ze zmrazených listů protokolem dle Torrese et al. (1993), kteří takto izolovali DNA u *Vicia faba* L. K v tekutém dusíku rozdrceným listům byl přidán pufr obsahující CTAB, 0,4% 2-merkptoethanol a 0,5 mM SDS. Přibližně 0,5 ml roztoku bylo přidáno do zkumavky obsahující 100 µl směsi chloroform:oktanol (24:1). Po protřepání proběhla inkubaci při 65 °C po dobu 30 minut. Po zchlazení při pokojové teplotě a zkumavka doplněna směsí chloroform:oktanol. Protřepáním vzniklá emulze byla centrifugována při 5 °C, 7000 x g po dobu 4 min. pro oddělení fází. Vodná fáze byla přenesena do další zkumavky, doplněna stejným množstvím 95% ethanolu (-20 °C) k precipitaci DNA. Získaná DNA byla vymyta 76% ethanolem a rozpuštěna ve 100 - 200 µl TE pufru (pH 8,0), spoluvysrážená RNA byla odstraněna přidáním 0,7 jednotek RNázy A (Torres et al., 1993).

Z takto extrahované DNA třešně (divoké populace i kultivarů) byl k amplifikaci cpDNA pomocí 16 párů univerzálních primerů a dalším analýzám připraven roztok v koncentraci 4 ng/μl (Mohanty et al., 2001).

Guarino et al. (2009) v obdobné studii diverzity jaderné DNA použili k extrakci DNA CTAB protokol dle Doyle et Doyle (1987): 1. Předehřejeme ve vodní lázni 5-7,5 ml CTAB pufru (2% hexadecyl trimethylamonium bromid, 1,4 M NaCl, 0,2% 2-merkptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) v 30ml centrifugačních zkumavkách na 60 °C. 2. Rozdrtíme 0,5-1,0 g čerstvých listů v 60 °C teplém CTAB pufru v nahřáté třecí misce. 3. Inkubujeme vzorek po dobu 15 - 60 min. při 60 °C za občasného promíchání. 4. Přidáme směs chloroform:izoamylalkohol (24:1), mícháme jemně, ale důkladně. Vzniknou dvě fáze – vrchní vodná obsahuje DNA, spodní chloroformová degradované proteiny a sekundární sloučeniny. 5. Centrifugujeme po dobu 10 minut, 6000 x g. 6. Vodnou fází přesuneme pipetou do skleněné zkumavky, přidáme 2/3 objemu studeného izopropanolu a jemně promícháme, abychom vysráželi nukleové kyseliny. Použijeme širokou pipetu, abychom neporušili dlouhou a tenkou molekulu DNA v roztoku. Pokud není vidět ani dlouhé vlákno, ani vločková struktura molekul, můžeme nechat vzorek několik hodin (přes noc) v pokojové teplotě. 7. Pokud je to možné, nukleové kyseliny navineme skleněným háčkem a přeneseme do promývacího pufru (76% EtOH, 10 mM octanu amonného). Centrifugujeme 1 – 2 min. Slijeme opatrně co nejvíc supernatantu. Opět přidáme pufr. 8. Po minimálně 20 min. promývání opět centrifugujeme po dobu 20 min. na vyšší otáčky. 9. Supernatant opatrně slijeme a pelet krátce sušíme při pokojové teplotě. 10. Pelet rozpustíme v TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4). 11. Přidáme RNázu A v koncentraci 10 μg/ml a inkubujeme 30 min. při 37 °C. 12. Vzorek doplníme dvěma objemy destilované vody nebo TE pufru, přidáme octan amonný (7,5 M, pH 7,7), zamícháme, přidáme 2,5 objemu studeného EtOH a jemně vysrážíme DNA. 13. Centrifugujeme 10 min. (10000 x g) v chlazené centrifuze. 14. Vzorek vysušíme na vzduchu a opět naředíme vhodným množstvím TE (Doyle et Doyle, 1987).

Touto metodou Guarino et al. (2009) získali k dalším analýzám a amplifikaci jaderné DNA specifickými primery dostatečně kvalitní vzorky DNA třešní, extrahované z 0,1 g tkáně mladých listů. Metoda je spolehlivá, ovšem velmi náročná časově.

Konečně Sharma et al. (2014) k extrakci DNA pro studium primerů pro alelo-specifickou PCR detekci použili minimalizovanou verzi CTAB protokolu Saghai-Maroofoa et al. (1984) s malou modifikací - změna inkubační doby při 65 °C z jedné hodiny na dvě, centrifugace při 5000 rpm, precipitace DNA stejným objemem směsi chloroform:izoamylalkohol (24:1) místo směsi chloroform:oktanol a finální precipitace DNA peletu opět při 5000 rpm.

Výsledná DNA byla dobře použitelná pro další analýzy, konkrétně PCR amplifikaci s alelo-specifickými primery.

3.5.1 Výběr metod vhodných pro extrakci DNA třešně

Při rozhodování, jakou metodu extrakce DNA v experimentech zvolit, hraje samozřejmě roli zkušenosti vlastní i poznatky ostatních badatelů uveřejněné na odborných fórech. Bylo by jistě možné, nebo dokonce žádoucí, experimentálně ověřit více metod, nebo některé vhodné metody modifikovat, abychom zjistili, která přinese optimální výsledek, který by sloužil při dalším studiu druhu *Prunus avium* L.

Není v možnostech této bakalářské práce provést srovnání většího množství metod, proto byly vybrány pro srovnání postupy s použitím dvou komerčních kitů a klasické metody CTAB.

4 Experimentální část

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Materiál

4.1.1.1 Rostlinný materiál

V experimentu byla DNA extrahována z listů a pupenů 10 odrůd a z kolekce embryí 2 planě rostoucích exemplářů druhu *Prunus avium* L.

Z čerstvých listů bylo odebráno vždy cca 100 mg materiálu, pupeny byly pro každý vzorek odebrány 2-3, v případě vzorku č. 4d pouze 1 (více jich nebylo k dispozici). Z nezralých zmrazených plodů bylo vždy do každého vzorku odebráno 1 embryo.

Vzorky z listů byly označeny **1a – 10a** a **1b – 10b**, vzorky z pupenů **1c – 10c** a **1d – 10d**. Vzorky z embryí byly označeny **H1 – H15** a **B1 – B15**.

4.1.1.2 Chemikálie

4.1.1.2.1 Chemikálie pro CTAB extrakci:

- extrakční pufr:
 - ✓ Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze)
 - ✓ ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)
 - ✓ sodiumdodecylsulfát (SDS)
 - ✓ polyvinylpyrrolidon (PVP)
 - ✓ cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB)
 - ✓ chlorid sodný (NaCl)
 - ✓ β-merkptoethanol
 - ✓ proteináza K
 - ✓ polyethylenglykol 4000 (PEG 4000)
- TE pufr:
 - ✓ Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl)
 - ✓ ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)

- RNáza A
- fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1)
- izopropanol
- ethanol (70%)
- tekutý dusík

4.1.1.2.2 Kity

- GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) a v něm obsažené a připravené chemikálie
- DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio) a v něm obsažené a připravené chemikálie

4.1.1.2.3 Chemikálie pro elektroforézu:

- agaróza
- pufr (Tris, EDTA, kyselina boritá), TBE pufr
- DNA standard (GeneRuler 100bp Plus)
- ethidiumbromid (zásobní roztok 1mg/ml, výsledná koncentrace 0,5 µg/ml)

4.1.1.3 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy (Boeco, Německo)
- ohříváč T- gradient (Biometra, Německo)
- vortex TechnoKartell TK 3S (Hertz, Německo)
- termoblok TDB-120 (Biosan, Litva)
- centrifuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Německo)
- centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Německo)
- spektrofotometr NanoPhotometer (Implen, Německo)
- thermocycler C1000™ (Bio-Rad, USA)
- dokumentační systém Gel-Doc (Bio-Rad, USA)
- pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- centrifugační mikrozkuřavky

4.1.2 Metody

4.1.2.1 Příprava rostlinného materiálu

- Z listů bylo naváženo vždy po 100 mg materiálu (20 vzorků z 10 odrůd, 1a – 10a, 1b – 10b, přeneseno do centrifugačních mikrozkušavek, v prostředí tekutého dusíku nadrceno na velmi jemný prášek.
- Ze stejných odrůd byly odebrány vždy 2 – 3 pupeny pro každý vzorek (20 vzorků z 10 odrůd, 1c – 10c, 1d – 10d, vzorek 4d obsahoval pouze 1 pupen). Pupeny byly vloženy do centrifugačních mikrozkušavek, v prostředí tekutého dusíku nadrceny na co nejjemnější prášek.
- Z 30 nezralých plodů 2 volně rostoucích „ptáčnic“ byla vypreparována embrya (vzorky H1 – H15, B1 – B15), přenesena do centrifugačních mikrozkušavek a homogenizována.

Takto připravené vzorky byly dále použity k extrakci v následujících protokolech:

4.1.2.2 Extrakce kitem GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

- Ke vzorkům do zkumavek bylo přidáno 350 μ l lyzačního pufru A a 50 μ l lyzačního pufru B, protřepáno na vortexu a převrácením promícháno. Dáno k inkubaci do termobloku na 10 minut při 65 °C.
- Přidáno 130 μ l precipitačního roztoku. Promícháno a dáno k inkubaci do mrazáku (-20 °C) na 5 minut. Po inkubaci 5 minut centrifugováno při 13000 rpm. Supernatant přenesen do GenElute filtrační zkumavky. Opět centrifugováno po dobu 1 min.
- Pro přípravu navázání nukleových kyselin bylo přidáno 500 μ l aktivačního roztoku do vázacích kolonek. Centrifugováno 1 min., filtrát odstraněn.
- K filtrátu do filtrační zkumavky bylo přidáno 700 μ l vázacího roztoku. Převrácením promícháno. 700 μ l směsi bylo přeneseno do vázacích kolonek, 1 minutu centrifugováno, filtrát odstraněn. Opakováno se zbytkem směsi.
- Do vázací kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího roztoku (s předem přidaným ethanolem). 1 minutu centrifugováno, vázací kolonky přemístěny do nových zkumavek. Přidáno dalších 500 μ l promývacího roztoku, centrifugováno 3 minuty.

- Vázací kolonky byly opět přemístěny do nových zkumavek, přidáno 100 µl elučního roztoku předeřátého na 65 °C. Centrifugováno 1 min. Eluce opakována.

Kitem **GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit** byly zpracovány tyto vzorky:

- **1a – 10a** (listy)
- **1c – 10c** (pupeny)
- **B1 – B10** (embrya)

4.1.2.3 Extrakce kitem DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)

- K připraveným vzorkům bylo přidáno 75 µl DEP-25 START-Blue reagens, promícháno.
- Vzorky byly zahřáty v termobloku při teplotě 95 °C po dobu 20 minut.
- Poté byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a přidáno 75 µl STOP reagens, obsah promíchán. Barva se změnila z modré na bezbarvou.

Kitem **DEP-25 DNA Extraction Kit** byly zpracovány tyto vzorky:

- **1b – 10b** (listy)
- **1d – 10d** (pupeny)
- **H6 – H15** (embrya)

4.1.2.4 Extrakce pomocí protokolu CTAB

- K vzorkům bylo přidáno 0,5 ml extrakčního pufru (100 mM Tris, pH 8; 20 mM EDTA; 1 % SDS; 2 % PVP; 2 % CTAB; 1,4 M NaCl; 1 % β-merkapt ethanol; 0,05 mg/mL proteináza K; 4 % PEG 4000; před použitím přidáno 0,2 % β-merkapt ethanolu) a poté byly inkubovány v termobloku při 65 °C po dobu 1 hodiny.
- Po vyjmutí z termobloku bylo přidáno 70 µl 5M roztoku NaCl obsahujícího 4 % PEG a následovala inkubace při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Poté byly vzorky centrifugovány 10 minut při 13000 rpm.
- Supernatant byl přenesen do nových zkumavek a přidáno 15 µl předeřátého SDS.
- K supernatantu byl přidán stejný objem (300 µl) směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1) a jemným převrácením (30-40x) promícháno.

- Vzorčky byly poté centrifugovány 10 minut při 13000 rpm a supernatant přenesen do nových zkumavek a vysrážen 2/3 objemu (200 µl) izopropanolu.
- Vysrážené nukleové kyseliny byly promyty 1 ml 70% ethanolu. Centrifugováno 10 min., ethanol slit a pelet usušen při 50 °C.
- Získaný pelet byl rozpuštěn v 50 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8; sterilizováno v autoklávu).

Tímto postupem byla extrahována DNA u těchto vzorků:

- **1b – 10b** (listy), vzorky 5b, 6b a 10b, byly ošetřeny 100 µl TE pufru
- **1d – 10d** (pupeny)
- **H1 – H5, B11 – B15** (embrya)

4.1.2.5 Extrakce pomocí protokolu CTAB s přidáním RNázy

- Postup totožný s předchozím protokolem.
- Na závěr k peletu rozpuštěnému v TE pufru přidána RNáza A, 10 mg/ml, inkubováno 30 min. při 37 °C a zamrzáno při -20 °C k dalšímu použití.

Tímto postupem byly zpracovány vzorky:

- **1b – 10b** (listy)
- **1d – 10d** (pupeny)
- vzorky z embryí nebyly zpracovány

4.1.2.6 Podmínky PCR

12,5 µl reakce obsahovala 20–30 ng DNA, 1x Tris-KCl reakční pufr, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,1 µM páru primerů pro amplifikaci genu S-RNázy (PaCons-F1 5´MCTTGTTCTTGS TTTYGCTTTCTT C3´ a PaCons1-R2 – 5´GCCATTGTTGCACAAATTGA3´) a 0,625 U *Taq* DNA polymerázy. Teplotně časový profil: 1x 94 °C 3 min, 35x 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 120 s, 1x 72 °C 600 s (thermocycler C1000, Bio-Rad).

4.1.2.7 Elektroforéza

Vzorek byl obarven nanášecí barvou složenou z 40% vodného roztoku sacharózy a 0,05% přídavku bromfenolové a xylencyanolové modři. Vzorky byly separovány v 1,5% agarózovém gelu (Serva) v elektroforézovém pufru 1xTBE (Sambrook et al., 1989) při 120 V 30 minut a vizualizovány pomocí dokumentačního systému GelDoc (Bio-Rad). Velikost PCR produktů byla odhadnuta na základě velikostního standardu GeneRuler 100bp plus (Thermo Fisher).

4.1.2.8 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byla použita analýza rozptylu ANOVA, konkrétně ANOVA jednofaktorová a ANOVA dvoufaktorová bez opakování. Byly hodnoceny koncentrace a čistota extrahované DNA kvantifikované spektrofotometrickým měřením (NanoPhotometer, Implen). Byla vyslovena nulová hypotéza H_0 nezávislosti naměřených hodnot na metodě extrakce pro jednofaktorovou analýzu a pro dvoufaktorovou analýzu bez opakování nulové hypotézy H_0^1 nezávislosti naměřených hodnot na použité metodě extrakce a nulová hypotéza H_0^2 nezávislosti naměřených hodnot na použitém rostlinném materiálu, ze kterého byla DNA extrahována. Parametry byly vyhodnocovány doplňkem Analýza dat pro Microsoft Excel 2010.

4.2 Výsledky

Na UV-spektrofotometru byly změřeny koncentrace získané DNA a změřeny poměry absorpance $A_{260/280}$ nm a $A_{260/230}$ nm. Získaná DNA byla amplifikována metodou PCR a poté přenesena na 1,5% agarózový gel a elektroforeticky separována. Gel byl poté vizualizován na dokumentačním zařízení Gel-Doc (Bio-Rad). Naměřené výsledky jsou představeny dle jednotlivých metod.

4.2.1 Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich

Tabulka 1: Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich, vzorky 1a – 10a

	DNA z listů - extrakce kitem GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)										
vzorek	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a	10a	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	7,075	2,358	4,717	7,075	7,075	9,434	9,434	9,434	11,800	11,800	8,020
A260/A280	1,500	1,000	1,000	1,500	1,500	2,000	2,000	4,000	1,667	2,500	1,867
A260/A230	0,013	0,021	0,091	0,009	0,176	0,111	0,065	0,444	0,031	0,057	0,102

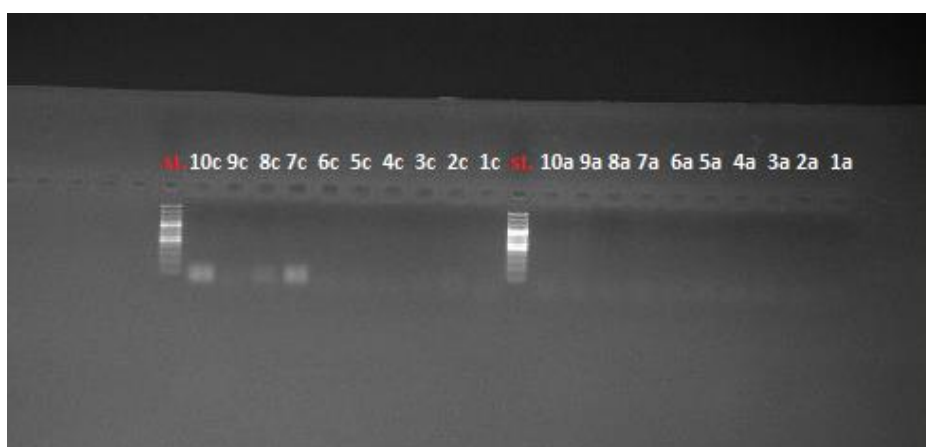
Tabulka 2: Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich, vzorky 1c – 10c

	DNA z pupenů - extrakce kitem GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)										
vzorek	1c	2c	3c	4c	5c	6c	7c	8c	9c	10c	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	23,600	18,900	11,800	7,075	14,200	9,434	14,200	9,434	4,717	9,434	12,279
A260/A280	1,000	1,600	1,667	1,000	1,500	1,333	1,500	1,333	1,000	2,000	1,393
A260/A230	0,145	0,105	0,066	0,333	0,400	0,400	0,097	0,154	0,250	0,025	0,198

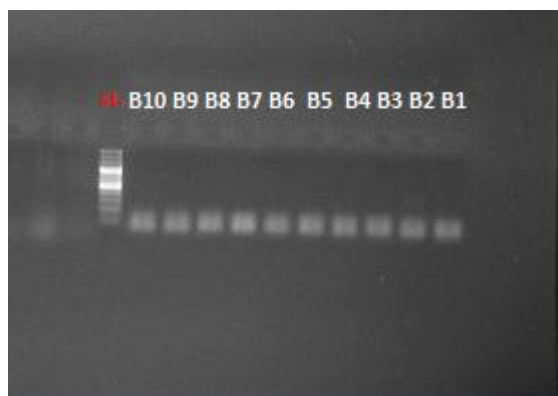
Tabulka 3: Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich, vzorky B1 – B10

	DNA z embryí - extrakce kitem GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)										
vzorek	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	7,075	2,358	9,434	9,434	2,358	4,717	4,717	7,075	21,200	11,800	8,017
A260/A280	1,500	---	---	4,000	---	---	---	1,500	2,250	2,500	2,350
A260/A230	---	---	0,098	0,100	---	---	0,031	---	0,692	0,263	0,237

Z výsledků vyplývá, že naměřené koncentrace byly velmi nízké, nejvyšší koncentrace byly naměřeny u vzorků z pupenů. Hodnoty absorbance jsou nejasné, výsledky měření se opakovaly, pravděpodobně způsobené nízkou koncentrací DNA ve vzorcích. Elektroforeogramy ukazují, že amplifikace vzhledem k velmi nízké koncentraci neproběhla úspěšně (obr. 7 a 8).



Obrázek 7: Elektroforeogram, extrakce kitem Sigma-Aldrich, vzorky 1a – 10a, 1c – 10c



Obrázek 8: Elektroforeogram, extrakce kitem Sigma-Aldrich, vzorky B1 – B10

4.2.2 Výsledky izolace kitem Top-Bio

Tabulka 4: Výsledky izolace kitem Top-Bio, vzorky 1b – 10b

	DNA z listů - extrakce DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)										
vzorek	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	450,000	590,000	439,000	467,000	408,000	314,000	413,000	415,000	425,000	342,000	426,300
A260/A280	1,384	1,479	1,442	1,277	1,418	1,385	1,471	1,467	1,440	1,436	1,420
A260/A230	0,437	0,430	0,470	0,436	0,494	0,530	0,529	0,521	0,514	0,514	0,488

Tabulka 5: Výsledky izolace kitem Top-Bio, vzorky 1d – 10d

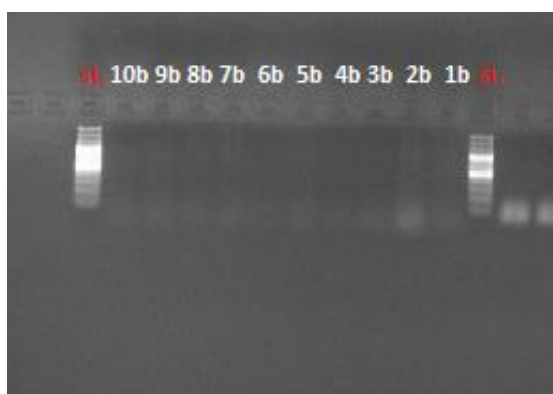
	DNA z pupenů - extrakce DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)										
vzorek	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	1 210,000	842,000	1 196,000	623,000	858,000	988,000	979,000	941,000	698,000	675,000	901,000
A260/A280	0,526	0,425	0,428	0,667	0,617	0,511	0,637	0,482	0,569	0,482	0,534
A260/A230	0,279	0,214	---	0,402	0,317	0,273	0,234	0,216	0,237	0,181	0,261

Tabulka 6: Výsledky izolace kitem Top-Bio, vzorky H6 – H15

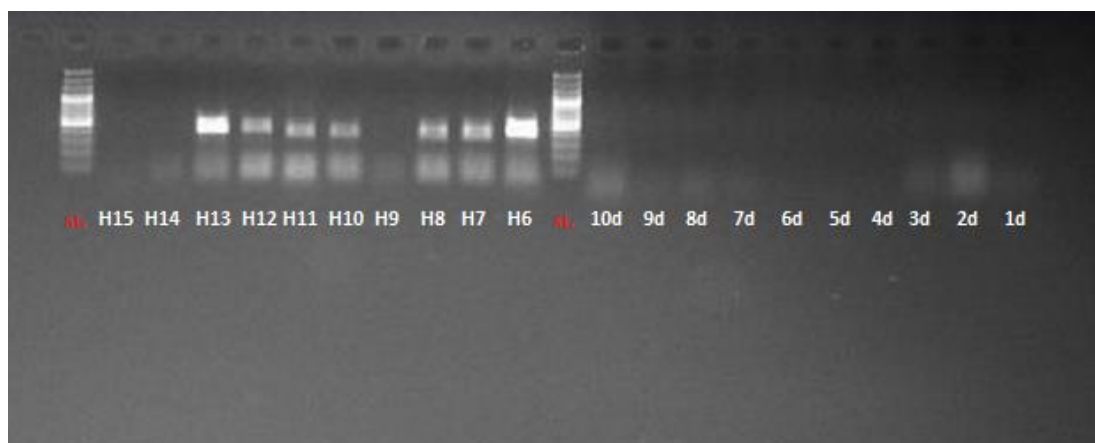
	DNA z embryí - extrakce DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)										
vzorek	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	170,000	104,000	87,300	35,400	75,500	203,000	113,000	170,000	118,000	68,400	114,460
A260/A280	1,674	1,692	1,762	1,500	1,882	1,830	1,846	1,674	1,282	1,450	1,659
A260/A230	0,600	0,595	0,638	0,556	0,681	0,656	0,593	0,686	0,595	0,604	0,620

Tyto naměřené výsledky ukazují výrazně vyšší hodnoty koncentrace izolované DNA, zejména u vzorků odebraných z pupenů. U DNA izolované z embryí je vidět vyšší čistota, vzorky nejsou zřejmě kontaminovány polysacharidy, proteiny apod. U listů a pupenů je patrná vyšší míra kontaminace, ať už těmito látkami či RNA. Elektroforeogramy těchto vzorků ukazují, že u listů a pupenů amplifikace neproběhla v pořádku (listy), nebo jen velmi slabě (pupeny) – pravděpodobně kvůli kontaminaci, u embryí naopak amplifikace proběhla

dle očekávání, byla detekována DNA o velikosti v intervalu 300 – 500 bp (obr. 10, vzorky H6, H7, H8, H10 – H13).



Obrázek 9: Elektroforeogram, extrakce kitem Top-Bio, vzorky 1b – 10b



Obrázek 10: Elektroforeogram, extrakce kitem Top-Bio, vzorky H6 – H15, 1d – 10d

4.2.3 Výsledky izolace dle protokolu CTAB

Tabulka 7: Výsledky izolace CTAB, vzorky 1b – 10b

vzorek	DNA z listů - extrakce CTAB										
	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	279,000	124,000	131,000	243,000	367,000	326,000	88,000	278,000	490,000	219,000	254,500
A260/A280	1,740	1,890	1,701	1,736	1,603	1,475	1,833	1,847	1,868	1,370	1,706
A260/A230	0,720	1,080	0,992	0,885	0,673	0,625	1,006	1,173	1,334	0,639	0,913

Tabulka 8: Výsledky izolace CTAB, vzorky 1d – 10d

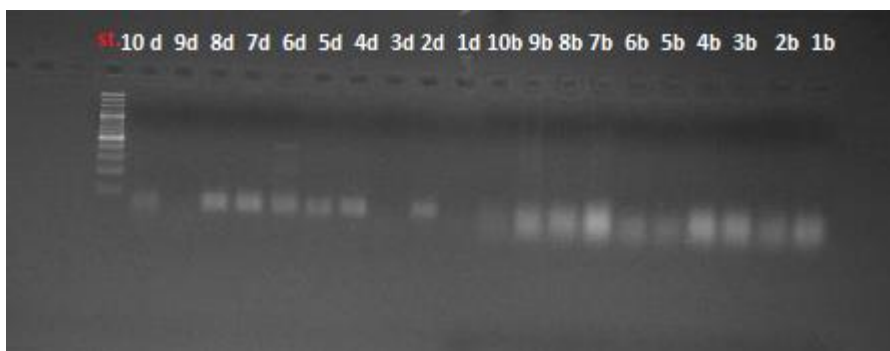
	DNA z pupenů - extrakce CTAB										
vzorek	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	5,000	5,000	2,500	1,500	2,000	1,500	3,500	3,500	5,000	5,000	3,450
A260/A280	1,429	1,667	1,667	3,000	2,000	3,000	1,750	2,333	1,429	2,000	2,028
A260/A230	0,556	0,883	0,556	0,300	0,500	0,750	0,875	1,000	0,769	0,667	0,686

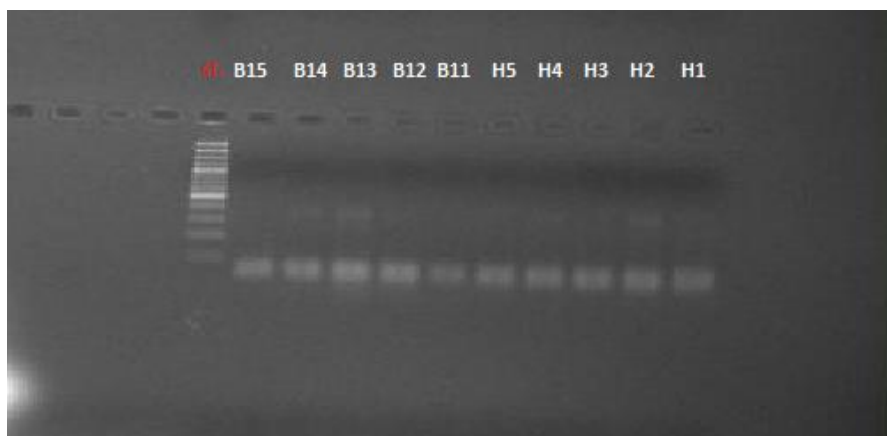
Tabulka 9: Výsledky izolace CTAB, vzorky H1 – H5, B11- B15

	DNA z embryí - extrakce CTAB										
vzorek	H1	H2	H3	H4	H5	B11	B12	B13	B14	B15	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	9,500	13,000	3,500	11,500	13,500	4,000	20,000	39,500	11,000	---	13,944
A260/A280	2,375	2,364	2,333	2,300	2,077	2,000	2,105	2,079	2,000	---	2,181
A260/A230	3,167	2,600	0,875	3,286	1,688	0,800	2,105	1,681	1,222	---	1,936

Výsledky izolace pomocí protokolu CTAB ukazují zejména u listů dobrou koncentraci izolované DNA, a také dobrou čistotu. U vzorků 5b, 6b, a 10b bylo namísto 50 μl TE přidáno 100 μl TE, z důvodu naměřeného příliš vysokého množství DNA. V případě pupenů je koncentrace signifikantně nižší, čistota velice kolísá, u izolace z embryí je o něco lepší koncentrace, hodnoty absorbance však napovídají kontaminaci RNA.

Elektroforeogramy nasvědčují velmi slabě proběhlé amplifikaci u listů a pupenů (obr. 11), o málo lepší výsledky amplifikace je možno vidět u embryí (obr. 12, vzorky H2, B13 a B14), kde jsou patrné molekuly DNA o přibližné velikost 300 - 400 bp.

**Obrázek 11: Elektroforeogram, extrakce CTAB, vzorky 1b – 10b, 1d – 10d**



Obrázek 12: Elektroforeogram, extrakce CTAB, vzorky B11 – B15, H1 – H5

4.2.4 Výsledky izolace dle protokolu CTAB se zařazením RNázy

Tabulka 10: Výsledky izolace CTAB s RNázou, vzorky 1b – 10b

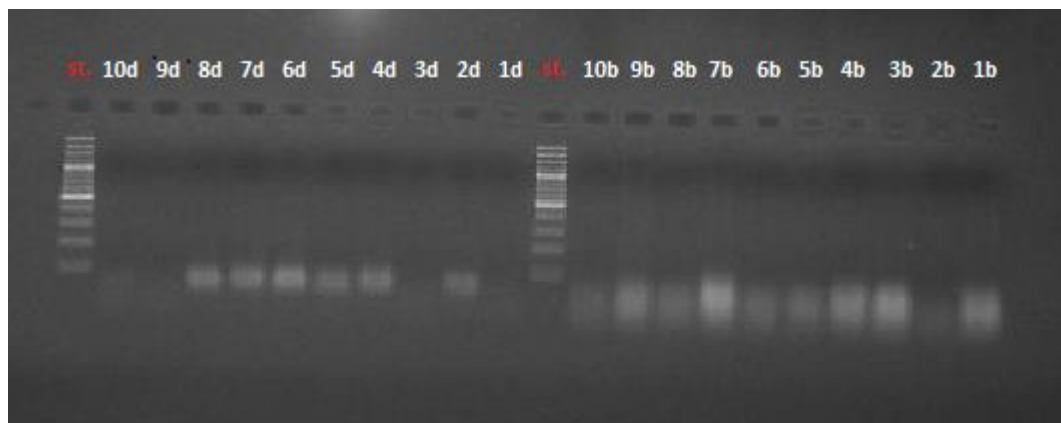
	DNA z listů - extrakce CTAB (s použitím RNázy)										
vzorek	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b	10b	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	284,000	184,000	287,000	282,000	284,000	337,000	318,000	201,000	375,000	310,000	286,200
A260/A280	1,711	1,868	1,683	1,689	1,560	1,456	1,879	1,774	1,827	1,335	1,678
A260/A230	0,770	1,168	1,023	0,895	0,638	0,683	1,224	1,249	1,374	0,623	0,965

Tabulka 11: Výsledky izolace CTAB s RNázou, vzorky 1d – 10d

	DNA z pupenů - extrakce CTAB (s použitím RNázy)										
vzorek	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	průměr
koncentrace DNA (ng/μl)	23,000	9,000	10,000	9,000	7,000	13,500	8,500	12,500	13,000	12,000	11,750
A260/A280	1,394	1,500	1,538	1,286	1,273	1,500	1,545	1,471	1,444	1,500	1,445
A260/A230	0,719	0,818	0,608	0,439	0,538	0,491	0,654	0,595	0,619	0,727	0,621

I při zařazení RNázy do protokolu je u listů a pupenů vidět z hodnot absorbance kontaminace, pravděpodobně polysacharidy, polyfenoly nebo proteiny, nicméně i tak jsou výsledky odpovídající. Koncentrace DNA u listů je velmi dobrá, u pupenů horší. V tomto protokolu nebyly analyzovány vzorky z embryí, vzhledem k nedostatku materiálu. Z ostatních výsledků je patrné, že by konkrétně tato analýza mohla přinést zajímavé výsledky.

Elektroforeogram (obr. 13) ukazuje neúspěšně proběhlou amplifikaci, zřejmě způsobenou kontaminací DNA sekundárními metabolity.



Obrázek 13: Elektroforeogram, extrakce CTAB s RNázou, vzorky 1b – 10b, 1d – 10d

4.2.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické zhodnocení by mělo ukázat, zda existují signifikantní rozdíly mezi úspěšností extrakce nukleových kyselin jednak mezi jednotlivými užitými metodami extrakce, jednak mezi užitými výchozími rostlinnými materiály. Byly tedy vyhodnoceny výsledky 4 metod extrakce u listů, pupenů a embryí (u embryí pouze 3 metod) metodou ANOVA: jeden faktor, a dále byly vyhodnoceny výsledky jednotlivých metod, a to tak, že byly vzaty průměry hodnot a vyhodnoceny metodou ANOVA: dva faktory bez opakování.

4.2.5.1 Výsledky koncentrace získané DNA

Metody jsou v tabulkách označeny následujícím způsobem (SA – kit Sigma-Aldrich, TB – kit Top-Bio, CTAB – protokol CTAB, CTABR – protokol CTAB s RNázou).

Výsledky analýzy rozptylu jsou prezentovány v tabulce jako celek, jednotlivé výpočtové tabulky jsou v příloze.

- **listy**

Byly porovnány všechny metody a výsledky získané koncentrace z listů. Již z charakteru výsledků bylo patrné, že analýza rozptylu ukáže závislost na metodě. Na hladině významnosti

$\alpha = 0,05$ lze zamítnout hypotézu o nezávislosti získané koncentrace na metodě extrakce ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 16 v příloze.

Pro upřesnění bylo zvoleno srovnání pouze 3 metod (s vyřazením metody SA, kde byly výsledky signifikantně rozdílné). I v tomto případě lze na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané koncentraci ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 17 v příloze.

Proto byly porovnány dvě metody, které se k sobě výsledky nejvíce blížily, protokoly CTAB a CTAB s použitím RNázy (v tabulce zkráceno jako CTABR). Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ již hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané koncentraci nelze zamítnout ($p > 0,05$, $F < F_{krit}$), viz tabulka 18 v příloze. Z hlediska získané koncentrace z listů je tedy nepodstatné, zda použijeme metodu extrakce dle protokolu CTAB či CTAB s použitím RNázy.

- **pupeny**

Byly porovnány všechny metody a výsledky získané koncentrace z pupenů. Opět z charakteru výsledků bylo patrné, že analýza rozptylu ukáže závislost na metodě. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ lze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané koncentraci ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 19 v příloze.

Proto byly porovnány i dvě metody, které se charakterem výsledků k sobě blížily, metoda CTABR a kit Sigma-Aldrich.

V tomto případě opět na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané koncentraci nelze zamítnout ($p > 0,05$; $F < F_{krit}$), viz tabulka 20 v příloze. Z hlediska získané koncentrace z pupenů je tedy nepodstatné, zda použijeme metodu extrakce dle protokolu CTABR či kit Sigma-Aldrich.

- **embrya**

V případě embryí byly porovnávány pouze tři metody. Metodou CTABR nebyla DNA z embryí extrahována. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ lze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané koncentraci ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 21 v příloze.

Proto byly ještě porovnány metody CTAB a SA, kde bylo lze dle výsledků předpokládat nezávislost na metodě. I v tomto případě opět na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané koncentraci nelze zamítnout ($p > 0,05$; $F < F_{krit}$), viz tabulka 22 v příloze. Z hlediska získané koncentrace z embryí je tedy nepodstatné, zda použijeme metodu extrakce dle protokolu CTAB či kit Sigma-Aldrich.

Tabulka 12: Přehled výsledků analýzy rozptylu – získaná koncentrace DNA

listy (koncentrace ng/ μ l)				pupeny (koncentrace ng/ μ l)				embrya (koncentrace ng/ μ l)		
SA	TB	CTAB	CTABR	SA	TB	CTAB	CTABR	SA	TB	CTAB
7,075	450,000	279,000	284,000	23,600	1 210,000	5,000	23,000	7,075	170,000	9,500
2,358	590,000	124,000	184,000	18,900	842,000	5,000	9,000	2,358	104,000	13,000
4,717	439,000	131,000	287,000	11,800	1 196,000	2,500	10,000	9,434	87,300	3,500
7,075	467,000	243,000	282,000	7,075	623,000	1,500	9,000	9,434	35,400	11,500
7,075	408,000	367,000	284,000	14,200	858,000	2,000	7,000	2,358	75,500	13,500
9,434	314,000	326,000	337,000	9,434	988,000	1,500	13,500	4,717	203,000	4,000
9,434	413,000	88,000	318,000	14,200	979,000	3,500	8,500	4,717	113,000	20,000
9,434	415,000	278,000	201,000	9,434	941,000	3,500	12,500	7,075	170,000	39,500
11,800	425,000	490,000	375,000	4,717	698,000	5,000	13,000	21,200	118,000	11,000
11,800	342,000	219,000	310,000	9,434	675,000	5,000	12,000	11,800	68,400	
p < 0,05; F > F_{krit}				p < 0,05; F > F_{krit}				p < 0,05; F > F_{krit}		
lze zamítnout H₀				lze zamítnout H₀				lze zamítnout H₀		
	TB	CTAB	CTABR		SA	CTABR		SA	CTAB	
	450,000	279,000	284,000		23,600	23,000		7,075	9,500	
	590,000	124,000	184,000		18,900	9,000		2,358	13,000	
	439,000	131,000	287,000		11,800	10,000		9,434	3,500	
	467,000	243,000	282,000		7,075	9,000		9,434	11,500	
	408,000	367,000	284,000		14,200	7,000		2,358	13,500	
	314,000	326,000	337,000		9,434	13,500		4,717	4,000	
	413,000	88,000	318,000		14,200	8,500		4,717	20,000	
	415,000	278,000	201,000		9,434	12,500		7,075	39,500	
	425,000	490,000	375,000		4,717	13,000		21,200	11,000	
	342,000	219,000	310,000		9,434	12,000		11,800		
p < 0,05; F > F_{krit}				p > 0,05; F < F_{krit}				p > 0,05; F < F_{krit}		
lze zamítnout H₀				nelze zamítnout H₀				nelze zamítnout H₀		
		CTAB	CTABR							
		279,000	284,000							
		124,000	184,000							
		131,000	287,000							
		243,000	282,000							
		367,000	284,000							
		326,000	337,000							
		88,000	318,000							
		278,000	201,000							
		490,000	375,000							
		219,000	310,000							
p > 0,05; F < F_{krit}				nelze zamítnout H₀				nelze zamítnout H₀		

4.2.5.2 Výsledky čistoty získané DNA (absorbance A260/280)

- **listy**

Při statistickém zpracování hodnot absorbance byla hladina významnosti opět nastavena $\alpha = 0,05$. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nelze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané čistotě DNA ($p > 0,05$; $F < F_{krit}$), viz tabulka 23 v příloze. Bylo přistoupeno k dalšímu porovnání.

Ve výběru tří metod (TB, CTAB, CTABR) lze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané čistotě DNA ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 24 v příloze. Dále byly porovnány pouze metody CTAB a CTABR.

Zde opět, jako v případě porovnání všech čtyř metod, dle výsledků nelze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané čistotě DNA ($p > 0,05$; $F < F_{krit}$), viz tabulka 25 v příloze.

- **pupeny**

Jako první byly opět srovnány výsledky čistoty získané DNA u všech čtyř metod. Na první pohled markantní rozptyl výsledků se projevil i v analýze rozptylu. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ lze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané čistotě DNA ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 26 v příloze.

Výběr byl v dalším testu zúžen na dvě metody (CTAB a CTABR), které vykazovaly největší podobnost. Nicméně i v tomto testu lze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané čistotě DNA ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 27 v příloze.

Při hodnocení závislosti čistoty extrahované DNA z pupenů je tedy možno konstatovat, že tato závislost jednoznačně existuje.

- **embrya**

U embryí byla závislost čistoty na metodě porovnávána opět pouze u tří metod. Vzhledem ke značnému rozptylu ve výsledcích a malému množství změřených hodnot u metody SA byl proveden pouze jeden test. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ opět lze zamítnout hypotézu o nezávislosti metody extrakce na získané čistotě DNA ($p < 0,05$; $F > F_{krit}$), viz tabulka 28 v příloze.

Tabulka 13: Přehled výsledků analýzy rozptylu – čistota získané DNA

listy (absorbance A 260/280)				pupeny (absorbance A 260/280)				embrya (absorbance A 260/280)			
SA	TB	CTAB	CTABR	SA	TB	CTAB	CTABR	SA	TB	CTAB	
1,500	1,384	1,740	1,711	1,000	0,526	1,429	1,394	1,500	1,674	2,375	
1,000	1,479	1,890	1,868	1,600	0,425	1,667	1,500		1,692	2,364	
1,000	1,442	1,701	1,683	1,667	0,428	1,667	1,538		1,762	2,333	
1,500	1,277	1,736	1,689	1,000	0,667	3,000	1,286	4,000	1,500	2,300	
1,500	1,418	1,603	1,560	1,500	0,617	2,000	1,273		1,882	2,077	
2,000	1,385	1,475	1,456	1,333	0,511	3,000	1,500		1,830	2,000	
2,000	1,471	1,833	1,879	1,500	0,637	1,750	1,545		1,846	2,105	
4,000	1,467	1,847	1,774	1,333	0,482	2,333	1,471	1,500	1,674	2,079	
1,667	1,440	1,868	1,827	1,000	0,569	1,429	1,444	2,250	1,282	2,000	
2,500	1,436	1,370	1,335	2,000	0,482	2,000	1,500	2,500	1,450		
$p > 0,05$; $F < F_{krit}$			nelze zamítnout H_0	$p < 0,05$; $F > F_{krit}$		lze zamítnout H_0		$p < 0,05$; $F > F_{krit}$		lze zamítnout H_0	
								CTAB	CTABR		
								1,429	1,394		
								1,667	1,500		
								1,667	1,538		
								3,000	1,286		
								2,000	1,273		
								3,000	1,500		
								1,750	1,545		
								2,333	1,471		
								1,429	1,444		
								2,000	1,500		
				$p < 0,05$; $F > F_{krit}$		lze zamítnout H_0					

4.2.5.3 Porovnání výsledků jednotlivých metod

V tomto kroku byly dvoufaktorovou metodou bez opakování ANOVA porovnány průměry naměřených hodnot, a to jak v případě získaného množství (koncentrace) DNA, tak v případě výsledků absorbance A 260/280. Hladina významnosti byla nastavena $\alpha = 0,05$.

- **koncentrace**

Tabulka 14: Přehled výsledků analýzy rozptylu dvoufaktorové – získaná koncentrace DNA

koncentrace	SA	TB	CTAB
c z listů průměr	8,020	426,300	254,500
c z pupenů průměr	12,2794	901,000	3,450
c z embryí průměr	8,017	114,460	13,944
$p_1 \text{ i } p_2 > 0,05, F^1 < F^1_{krit}, F^2 < F^2_{krit} .$			
nelze zamítnout H_0^1			
nelze zamítnout H_0^2			

Z uvedených výsledků vyplývá, že jak metoda extrakce, tak použitý materiál nemají vliv na koncentraci extrahované DNA. Při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou obě hodnoty p_1 i $p_2 > 0,05$, hodnota $F^1 < F^1_{krit}$ a hodnota $F^2 < F^2_{krit}$. Výpočet analýzy rozptylu viz tabulka 29 v příloze.

V tomto porovnání nebyla zahrnuta metoda CTABR, protože touto metodou nebyla extrahována DNA z embryí a metodika statistického vyhodnocení nedovoluje použít neúplné výsledky.

- **absorbance A260/280**

Tabulka 15: Přehled výsledků analýzy rozptylu dvoufaktorové – čistota získané DNA

absorbance	SA	TB	CTAB
A z listů průměr	1,867	1,420	1,706
A z pupenů průměr	1,393	0,534	2,028
A z embryí průměr	2,350	1,659	2,181
$p_1 \text{ i } p_2 > 0,05, F^1 < F^1_{krit}, F^2 < F^2_{krit} .$			
nelze zamítnout H_0^1			
nelze zamítnout H_0^2			

I v tomto případě z výsledků vyplývá, že jak metoda extrakce, tak použitý materiál nemají vliv na hodnoty čistoty extrahované DNA, vyjádřené poměrem absorbance A 260/280. Při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou obě hodnoty p_1 i $p_2 > 0,05$, hodnota $F^1 < F^1_{krit}$ a hodnota $F^2 < F^2_{krit}$. Výpočet analýzy rozptylu viz tabulka 30 v příloze.

Důvodem těchto výsledků jsou pravděpodobně příliš velké výsledkové rozdíly v rámci jednotlivých metod a i v rámci jednotlivých rostlinných materiálů. Z komplexního porovnání nelze konstatovat převahu jedné metody nad ostatními, ani výhodnost použití jednoho konkrétního materiálu.

5 Diskuse

Porovnání metod extrakce DNA přineslo zajímavé a celkem vypovídající výsledky, potvrzující, že extrahovat DNA z druhu *Prunus avium* L., vyhovující kvalitativně i kvantitativně, není jednoduché.

Do současné doby bylo vyvinuto a použito mnoho protokolů extrakce rostlinné DNA (Saghai-Marooof, 1984; Sambrook et al., 1989; Thomas et al., 1993; Lodhi et al., 1994; Lefort et al., 1998) včetně četných modifikací. Xin et Chen (2012) konstatovali, že ani pro velmi příbuzné druhy nemusí být vždy vyhovující jeden protokol. Při hledání optimální metody extrakce kvalitativně i kvantitativně vyhovující DNA je zapotřebí vycházet z podrobného studia obsahu látek, které by mohly extrakci komplikovat, vždy však bude nutné teoreticky navržené postupy a protokoly verifikovat experimentálně.

Očekávané výsledky použitých protokolů vycházely z dostupné literatury na téma extrakce DNA z rostlinného materiálu a extrakce DNA u druhu *Prunus avium* L., i když tyto se a priori nezabývaly srovnáním jednotlivých metod, a z primárního určení komerčních kitů. Protokol CTAB byl vytvořen přímo pro izolaci nukleových kyselin z rostlinného materiálu, kit Sigma-Aldrich je primárně určen k izolaci DNA z rostlinného materiálu (www.sigmaaldrich.com, 2016), naopak kit Top-Bio primárně určen k extrakci DNA z živočišných buněk (www.top-bio.cz, 2016). Přesto konečné vyhodnocení ukázalo lepší výsledky jednoduchého kitu Top-Bio, zejména v případě embryí, kde byly výsledky pozitivně ovlivněny malou přítomností interferujících látek (barviv, cukrů, gum, RNA apod.)

Statistické vyhodnocení ukázalo převážně významné rozdíly jednotlivých metod ve výtěžnosti a čistotě získané DNA, některé metody vykazovaly rozdíly statisticky nevýznamné (v případě porovnání metod CTAB a CTAB s RNázou při extrakci DNA z listů a získané koncentrace, stejně tak v případě porovnání metod CTAB s RNázou a kitu Sigma-Aldrich při extrakci z pupenů a získané koncentrace a v případě porovnání metod CTAB a kitu Sigma-Aldrich při extrakci z embryí a získané koncentrace).

Co se týká absolutního množství (resp. absolutních hodnot získané koncentrace) nejvyšší hodnoty vykazala metoda kitem Top-Bio při extrakci z pupenů (průměrná hodnota 901,0 ng/μl), stejná metoda při extrakci z listů (průměrná hodnota 426,3 ng/μl) a obě metody CTAB

a CTAB s RNázou (průměrná hodnota 254,5, resp. 286,2 ng/μl). V případě kitu Top-Bio nebyly produkty lyzace z roztoku nijak odstraněny a tuto vyšší koncentraci lze vysvětlit interferencí sekundárních metabolitů s DNA. Pokud by bylo potřeba pracovat s čistou DNA, bylo by zřejmě nutné vzorky dále zpracovat některou z extrakčních metod.

Čistota extrahované DNA dle absorbance 260/280 nm byla v absolutních hodnotách nejlepší u metody kitem Top-Bio (průměr 1,659) při extrakci z embryí a opět obě metody CTAB a CTAB s RNázou (průměr 1,706, resp. 1,678) při extrakci z listů. Čistou DNA indikují hodnoty v rozmezí 1,7 – 1,9, snížení hodnoty naznačuje kontaminaci proteiny, zvýšení pak přítomnost RNA (Varma et al., 2007). Vysoká čistota DNA z embryí kitem Top-Bio je tak pravděpodobně způsobena nepřítomností či přítomností pouze malého množství kontaminantů.

Klíčovým ukazatelem kvality extrahované DNA je její použitelnost pro další analýzy (Akkurt, 2012). Výsledky proto byly též podpořeny amplifikací izolované DNA metodou PCR, nicméně její úspěšnost byla velmi kolísavá. Nejlépe amplifikovala DNA získaná z embryí kitem Top-Bio, na elektroforeogramu jsou viditelné fragmenty DNA v očekávané velikosti cca 300 – 500 bp, slabá amplifikace proběhla u vzorků extrahovaných z pupenů také kitem Top-Bio a u vzorků izolovaných protokolem CTAB z embryí a pupenů, amplifikace nebyla úspěšná u vzorků získaných kitem Sigma-Aldrich a u protokolu CTAB s RNázou, získaná DNA byla pravděpodobně kontaminována. Vzhledem k nedostatku materiálu nebyla DNA z embryí izolována protokolem CTAB s RNázou, který by mohl teoreticky přinést dobré výsledky, a jistě by bylo zajímavé je porovnat s výsledku kitu Top-Bio.

Neméně důležitým faktorem při porovnávání jednotlivých metod je jejich časová náročnost, pracnost a cena. Z tohoto srovnání vyšel v experimentu jednoznačně nejlépe kit DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio), který je velice rychlý (celková doba extrakce je cca 30 minut), jednoduchý (použití pouze dvou připravených reagensí) a velice levný zejména ve srovnání s ostatními komerčními kity (4,- Kč/vzorek oproti více než 100,- Kč/vzorek u kitu Sigma-Aldrich). Kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) je z hlediska časové náročnosti jen o něco horší (cca 60 min.), pracnost je výrazně vyšší (větší množství kolonek, reagensí a kroků izolace), největší nevýhodou je však markantně vyšší cena.

Tradiční protokoly nejsou sice příliš náročné finančně (cca 10,- Kč/vzorek) (Čurn et al., 2008), ale jsou velice pracné, časově náročné a mnohdy vyžadují práci s toxickými látkami.

Do praxe by mohla metoda izolace DNA z embryí kitem Top-Bio přinést jednoduchou, rychlou a levnou alternativu extrakce klasické všude tam, kde je zapotřebí analyzovat velké množství vzorků, tedy např. šlechtitelům při studiu populační struktury a dynamiky nebo v komerčních a semenných sadech třešně ptačí při studiu dynamiky opylení. Extrakce z embryí ovšem předpokládá mít k dispozici materiál, tedy již plodící rostliny, což je časově náročné. Rychlejší výsledky by samozřejmě přinášela spolehlivá metoda extrakce z listů. Případná experimentálně ověřená modifikace či kombinace tohoto kitu s některou z klasických extrakčních metod by mohla přinést i méně náročnou a spolehlivou metodu extrakce DNA pro další studium diverzity, genetických zdrojů, odrůdových genových diferencí, při tvorbě nových odrůd apod. v rámci druhu *Prunus avium* L.

6 Závěr

- Prvním cílem této bakalářské práce bylo zmapovat v dostupné literatuře postupy izolace rostlinné DNA a zejména DNA třešně (*Prunus avium* L.). Literární prameny jsou v tomto ohledu bohaté, spíše však v obecné rovině izolace z rostlinného materiálu, popř. izolace u jiných druhů. Primárně o postupech izolace u třešně je literatury poskrovnu, nicméně dostupné práce byly citovány se zřetelem na konkrétní postupy extrakce DNA.
- Druhým cílem práce bylo v experimentální části kvalitativní a kvantitativní porovnání výsledků extrakce třemi (alternativně čtyřmi) metodami ze tří typů rostlinných tkání. Byly porovnány metody pomocí dvou komerčních kitů - GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA) a DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio, ČR) a jednoho klasického protokolu CTAB (ve variantách bez použití a s použitím RNázy). DNA byla izolována ze tří typů rostlinných tkání (z listů, z pupenů a z embryí). Získaná DNA byla amplifikována pomocí metody PCR, separována následnou elektroforézou. Výsledky byly zaznamenány a statisticky vyhodnoceny. Cíl práce byl splněn.
- Jak bylo konstatováno v teoretické části této práce, třešeň ve svých četných ušlechtilých odrůdách je velmi oblíbeným ovocem s nezanedbatelným obsahem biologicky aktivních látek. Pro její další studium na molekulární úrovni by bylo velmi vhodné mít k dispozici spolehlivou metodu extrakce DNA ve vysoké kvalitě i kvantitě. Tato práce by s ohledem na výsledky mohla nabídnout výchozí bod pro další experimenty.

7 Použitá literatura

- Akkurt, M. 2012. Comparison between modified DNA extraction protocols and commercial isolation kits in grapevine (*Vitis vinifera* L.) Genetics and molecular research. 11 (3). 2343-2351.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P. 2013. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. Food Chemistry. 140 (4). 630–638.
- Basanta, M., de Escalada Plá, M. F., Raffo, M. D., Stortza, C. A., Rojas, A. M. 2014. Cherry fibers isolated from harvest residues as valuable dietary fiber and functional food ingredients. Journal of Food Engineering. 126. 149–155.
- Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. 2015. Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. Food Chemistry. 173. 1045–1053.
- Čurn, V., Nováková, A., Šimáčková, K., Kubátová, B. 2008. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.). Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích. České Budějovice. 55 s. ISBN: 978-80-7394-135-2.
- Doyle, J., Doyle, J. 1987. A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19. 11–15.
- Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., Cipriani, G. 2009. *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars. Genome. 52 (4). 320-337.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, R. J. 2014. Protocol: a simple method for extracting nextgeneration sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods. 10 (1). 1-17.
- Chrtek, J. 1992: *Amygdalaceae* D. Don. In: Hejný, S., Slavík, B. (eds.). Květena České republiky 3. Academia. Praha. 542 s. ISBN: 80-200-0256-1.
- Kirschner, J. 2002: *Rosaceae* Juss., *Prunus* L. In: Kubát, K., Hroudá, L., Chrtek, J. jun., Kaplan, Z., Kirschner, J., Štěpánek, J. (eds.). Klíč ke květeně České Republiky. Academia, Praha. 928 s. ISBN: 80-200-0836-5.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., Douglas, G. C. 1998. Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tullynally, Ireland. Silvae Genetics. 47. 5-6.
- Lisby, G. 1999. Application of Nucleic Acid Amplification in Clinical Microbiology. Molecular Biotechnology. 12 (1). 75-99.

- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Report*. 12. 6-13.
- Mohanty, A., Martin, J. P., Aguinalalde, I. 2001. Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 103 (1). 112-117.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262 (4). 56-61, 64-5.
- Pečová, M., Zajoncová, L., Poláková, K., Čuda, J., Šafaříková, M., Šebela, M., Šafařík, I. 2011. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 105 (7). 524-530.
- Picariello, G., De Vito, V., Ferranti, P., Paolucci, M., Volpe, M. G. 2016. Species- and cultivar-dependent traits of *Prunus avium* and *Prunus cerasus* polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 45. 50–57.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2 (3). 225-238.
- Průša, R. 1997. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 2. Lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s r.o. Praha. 48 s. ISBN: 80-238-0940-7.
- Saghai-Marroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 81. 8014–8018.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Plainview, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Serra, A. T., Matias, A. A., Almeida, A. P. C., Bronze, M. R., Alves, P. M., de Sousa, H. C., Duarte, C. M. M. 2011. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 2. Evaluation of SCF extracts as promising natural chemotherapeutical agents. *The Journal of Supercritical Fluids*. 55 (3). 1007–1013.
- Sharma, K., Sedlak, P., Zeka, D., Vejl, P., Soukup, J. 2014. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility alleles S-3, S-4 and S-9 using consensus and allele-specific primers in the Czech Republic. *Horticultural Science*. 41 (4). 153-159.
- Shepherd, M., Cross, M., Stokoe, R. L., Scott, L. J., Jones, M. E. 2002. Highthroughput DNA extraction from forest trees. *Plant Molecular Biology Report*. 20. 425-425.

- Schmitz-Eiberger, M. A., Blanke, M. M. 2012. Bioactive components in forced sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.), antioxidative capacity and allergenic potential as dependent on cultivation under cover. *LWT - Food Science and Technology*. 46 (2). 388–392.
- Štípek, S. 1998. *Stručná biochemie. Uchování a exprese genetické informace*. Medprint. Praha. 92 s. ISBN: 8090203620.
- Thomas, M. R., Matsumoto, S., Cain, P., Scott, N. S. 1993. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*. 86. 173-180.
- Todorova, K., Kolev, V., Nacheva, G., Ivanov, I. G. 2002. Isolation of plasmid DNA by adsorption on glass fibers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 16 (1). 145-147.
- Torres, A. M., Weeden, N. F., Martín, A. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*. 85 (8). 937-945.
- Varma, A., Padh, H., Shrivastava, N. 2007. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. 2. 386-392.
- Vuosku, J., Jaakola, L., Jokipii, S., Karppinen, K., Kämäräinen, T., Pelkonen, V. P., Jokela, A., Sarjala, T., Hohtola, A., Häggman, H. 2004. Does extraction of DNA and RNA by magnetic fishing work for diverse plant species? *Molecular Biotechnology*. 27 (3). 209-215.
- Vural, H. C. 2009. Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. *Scientific Research Essays*. 4. 59-64.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric. Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 22. 474-481.
- Xin, Z., Chen, J. 2012. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*. 8. 26.
- Yigit, D., Baydas, E., Güteryüz, M. 2009. Elemental analysis of various cherry fruits by wavelength dispersive x-ray fluorescence spectrometry. *Asian Journal of Chemistry*. 21 (4). 2935-2942.
- Zhang, L., Wang, B., Pan, L., Peng, J. 2013. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics*. 40 (1). 45-54.

8 Internetové zdroje

BioLib. 24. 3. 2016. [online] [cit. 2016-03-24]. Dostupné z <<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id39509/>>

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2015. [online] FAO statistical database. [cit. 2016-03-18]. Dostupné z <<http://faostat.fao.org.infozdroje.czu.cz>>

Qiagen, Německo. [online] [cit. 2016-03-21]. Dostupné z <<https://www.qiagen.com>>

Sigma – Aldrich, USA. [online] [cit. 2016-03-21]. Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com>>

Thermo Fisher Scientific, Inc., USA. [online] [cit. 2016-03-21]. Dostupné z <<http://www.thermofisher.com>>

Top-Bio, Česká Republika. [online] [cit. 2016-03-21]. Dostupné z <<http://www.top-bio.cz/>>

9 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: <i>Prunus avium</i> L., habitus v květu	11
Obrázek 2: <i>Prunus avium</i> L., květy	12
Obrázek 3: <i>Prunus avium</i> L., plody.....	12
Obrázek 4: Struktura DNA.....	15
Obrázek 5: Schéma principu PCR	20
Obrázek 6: Schéma extrakce DNA s využitím magnetických částic.	24
Obrázek 7: Elektroforeogram, extrakce kitem Sigma-Aldrich, vzorky 1a – 10a, 1c – 10c.....	34
Obrázek 8: Elektroforeogram, extrakce kitem Sigma-Aldrich, vzorky B1 – B10	35
Obrázek 9: Elektroforeogram, extrakce kitem Top-Bio, vzorky 1b – 10b	36
Obrázek 10: Elektroforeogram, extrakce kitem Top-Bio, vzorky H6 – H15, 1d – 10d	36
Obrázek 11: Elektroforeogram, extrakce CTAB, vzorky 1b – 10b, 1d – 10d	37
Obrázek 12: Elektroforeogram, extrakce CTAB, vzorky B11 – B15, H1 – H5	38
Obrázek 13: Elektroforeogram, extrakce CTAB s RNázou, vzorky 1b – 10b, 1d – 10d.....	39
Tabulka 1: Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich, vzorky 1a – 10a.....	34
Tabulka 2: Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich, vzorky 1c – 10c.....	34
Tabulka 3: Výsledky izolace kitem Sigma-Aldrich, vzorky B1 – B10	34
Tabulka 4: Výsledky izolace kitem Top-Bio, vzorky 1b – 10b.....	35
Tabulka 5: Výsledky izolace kitem Top-Bio, vzorky 1d – 10d.....	35
Tabulka 6: Výsledky izolace kitem Top-Bio, vzorky H6 – H15	35
Tabulka 7: Výsledky izolace CTAB, vzorky 1b – 10b	36
Tabulka 8: Výsledky izolace CTAB, vzorky 1d – 10d	37
Tabulka 9: Výsledky izolace CTAB, vzorky H1 – H5, B11- B15	37
Tabulka 10: Výsledky izolace CTAB s RNázou, vzorky 1b – 10b	38
Tabulka 11: Výsledky izolace CTAB s RNázou, vzorky 1d – 10d	38
Tabulka 12: Přehled výsledků analýzy rozptylu – získaná koncentrace DNA.....	41
Tabulka 13: Přehled výsledků analýzy rozptylu – čistota získané DNA.....	43
Tabulka 14: Přehled výsledků analýzy rozptylu dvoufaktorové – získaná koncentrace DNA	44
Tabulka 15: Přehled výsledků analýzy rozptylu dvoufaktorové – čistota získané DNA	44
9.1 Seznam příloh	
Tabulka 16: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z listů	56
Tabulka 17: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod TB, CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z listů.....	56

Tabulka 18: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z listů	56
Tabulka 19: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z pupenů	57
Tabulka 20: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA a CTABR u koncentrace DNA získané z pupenů	57
Tabulka 21: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB a CTAB u koncentrace DNA získané	57
Tabulka 22: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA a CTAB u koncentrace DNA získané	58
Tabulka 23: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB a CTABR u čistoty DNA získané	58
Tabulka 24: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod TB, CTAB a CTABR u čistoty DNA získané	58
Tabulka 25: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod CTAB a CTABR u čistoty DNA získané	59
Tabulka 26: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB a CTABR u čistoty DNA získané	59
Tabulka 27: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod CTAB a CTABR u čistoty DNA získané	59
Tabulka 28: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB a CTAB u čistoty DNA získané z embryí	60
Tabulka 29: Dvoufaktorová analýza ANOVA bez opakování, porovnání průměrných hodnot získaných koncentrací z listů, pupenů a embryí metodami SA, TB a CTAB	60
Tabulka 30: Dvoufaktorová analýza ANOVA bez opakování, porovnání průměrných hodnot absorbance A _{260/280} z listů, pupenů a embryí metodami SA, TB a CTAB	61

10 Přílohy

Tabulka 16: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z listů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
SA	10	80,202	8,0202	8,9135684		
TB	10	4263	426,3	5504,011111		
CTAB	10	2545	254,5	15086,5		
CTABR	10	2862	286,2	3308,4		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	908106,0601	3	302702	50,6448452	0,0000000000005	2,866266
Všechny výběry	215170,4221	36	5976,956			
Celkem	1123276,482	39				

Tabulka 17: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod TB, CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z listů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
TB	10	4263	426,3	5504,011111		
CTAB	10	2545	254,5	15086,5		
CTABR	10	2862	286,2	3308,4		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	167160,5	2	83580,23	10,49172068	0,000425282	3,354131
Všechny výběry	215090,2	27	7966,304			
Celkem	382250,7	29				

Tabulka 18: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z listů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
CTAB	10	2545	254,5	15086,5		
CTABR	10	2862	286,2	3308,4		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	5024,45	1	5024,45	0,546287	0,469368196	4,413873
Všechny výběry	165554,1	18	9197,45			
Celkem	170578,55	19				

Tabulka 19: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB, CTABR u koncentrace DNA získané z pupenů

Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
SA	10	122,794	12,2794	32,01779		
TB	10	9010	901	41406,44		
CTAB	10	34,5	3,45	2,247222		
CTABR	10	117,5	11,75	20,34722		
ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	5965832	3	1988611	191,8534	3,42022E-22	2,866266
Všechny výběry	373149,5	36	10365,26			
Celkem	6338982	39				

Tabulka 20: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA a CTABR u koncentrace DNA získané z pupenů

Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
CTABR	10	117,5	11,75	20,34722		
SA	10	122,794	12,2794	32,01779		
ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	1,401322	1	1,401322	0,053521	0,819654895	4,413873
Všechny výběry	471,2851	18	26,18251			
Celkem	472,6865	19				

Tabulka 21: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB a CTAB u koncentrace DNA získané z embryí

Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
SA	10	80,168	8,0168	31,08018		
TB	10	1144,6	114,46	2751,149		
CTAB	9	125,5	13,94444	116,6528		
ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	70533,85	2	35266,93	35,3032	0,0000000389	3,369016
Všechny výběry	25973,29	26	998,9726			
Celkem	96507,14	28				

Tabulka 22: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA a CTAB u koncentrace DNA získané z embryí

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
CTAB	9	125,5	13,94444	116,6528		
SA	10	80,168	8,0168	31,08018		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	166,4383	1	166,4383	2,332714	0,145072021	4,451322
Všechny výběry	1212,944	17	71,34964			
Celkem	1379,382	18				

Tabulka 23: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB a CTABR u čistoty DNA získané z listů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
SA	10	18,667	1,8667	0,770356		
TB	10	14,199	1,4199	0,003601		
CTAB	10	17,063	1,7063	0,030562		
CTABR	10	16,782	1,6782	0,032223		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	1,02606	3	0,34202	1,63501	0,198380713	2,866266
Všechny výběry	7,530671	36	0,209185			
Celkem	8,556731	39				

Tabulka 24: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod TB, CTAB a CTABR u čistoty DNA získané z listů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
TB	10	14,199	1,4199	0,003601		
CTAB	10	17,063	1,7063	0,030562		
CTABR	10	16,782	1,6782	0,032223		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	0,498445	2	0,249222	11,26249	0,000277513	3,354131
Všechny výběry	0,597471	27	0,022129			
Celkem	1,095915	29				

Tabulka 25: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod CTAB a CTABR u čistoty DNA získané z listů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
CTAB	10	17,063	1,7063	0,030562		
CTABR	10	16,782	1,6782	0,032223		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	0,003948	1	0,003948	0,125764	0,726986068	4,413873
Všechny výběry	0,565066	18	0,031393			
Celkem	0,569014	19				

Tabulka 26: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB, CTAB a CTABR u čistoty DNA získané z pupenů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
SA	10	13,933	1,3933	0,108869		
TB	10	5,344	0,5344	0,007281		
CTAB	10	20,275	2,0275	0,337743		
CTABR	10	14,451	1,4451	0,009541		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	11,35128	3	3,783762	32,65852	2,24982E-10	2,866266
Všechny výběry	4,1709	36	0,115858			
Celkem	15,52218	39				

Tabulka 27: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod CTAB a CTABR u čistoty DNA získané z pupenů

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
CTAB	10	20,275	2,0275	0,337743		
CTABR	10	14,451	1,4451	0,009541		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	1,695949	1	1,695949	9,766935	0,005847576	4,413873
Všechny výběry	3,125553	18	0,173642			
Celkem	4,821502	19				

Tabulka 28: Jednofaktorová analýza rozptylu, srovnání metod SA, TB a CTAB u čistoty DNA získané z embryí

Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
SA	5	11,75	2,35	1,05		
TB	10	16,592	1,6592	0,037464		
CTAB	9	19,633	2,181444	0,025113		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	2,070219	2	1,03511	4,587783	0,022229035	3,4668
Všechny výběry	4,738084	21	0,225623			
Celkem	6,808303	23				

Tabulka 29: Dvoufaktorová analýza ANOVA bez opakování, porovnání průměrných hodnot získaných koncentrací z listů, pupenů a embryí metodami SA, TB a CTAB

<i>Faktor</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
c z listů průměr	3	688,8202	229,6067	44204,25		
c z pupenů průměr	3	916,7294	305,5765	265916,4		
c z embryí průměr	3	136,4212	45,47375	3578,111		
SA	3	28,3164	9,4388	6,051759		
TB	3	1441,76	480,5867	156871,6		
CTAB	3	271,8944	90,63148	20167,2		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Řádky	107329,8	2	53664,89	0,869913	0,485649118	6,944272
Sloupce	380637,6	2	190318,8	3,085085	0,154690462	6,944272
Chyba	246759,9	4	61689,97			
Celkem	734727,3	8				

Tabulka 30: Dvoufaktorová analýza ANOVA bez opakování, porovnání průměrných hodnot absorbance A 260/280 z listů, pupenů a embryí metodami SA, TB a CTAB

<i>Faktor</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
A z listů průměr	3	4,9929	1,6643	0,051231		
A z pupenů průměr	3	3,9552	1,3184	0,561544		
A z embryí průměr	3	6,190644	2,063548	0,129726		
SA	3	5,61	1,87	0,228827		
TB	3	3,6135	1,2045	0,351092		
CTAB	3	5,915244	1,971748	0,058772		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Řádky	0,834292	2	0,417146	3,765798	0,120320921	6,94427191
Sloupce	1,041913	2	0,520956	4,702951	0,08902827	6,94427191
Chyba	0,443089	4	0,110772			
Celkem	2,319293	8				