

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



STUDIUM POLYMORFIZMU DNA MRKVE

Bakalářská práce

Vedoucí diplomové práce
Ing. Tomáš Vyhnánek, PhD.

Vypracovala
Darina Sejbalová

Brno 2016

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „ Studium polymorfizmu DNA mrkve“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu Ing. Tomáši Vyhnánkovi, PhD. za obětavou pomoc během vypracování bakalářské práce, za ochotu a cenné rady při konzultacích a za odborné vedení při praktické činnosti v laboratořích. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Janu Prášilovi z firmy SEMO, a.s. Smržice za poskytnutí rostlinného materiálu a odborné rady. A v neposlední řadě děkuji i své rodině za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Obsahem této práce je teoretické a praktické studium genetické diverzity mrkve obecné. Cílem byla analýza polymorfismu DNA *Daucus carota L.* pomocí metod molekulární biologie na bázi izolace DNA, PCR a elektroforetická separace. Celkem bylo analyzováno 20 vzorků mrkve s využitím 10 mikrosatelitních markerů. Bylo detekováno celkem 50 alel s průměrem pěti alel na lokus a velikostí alel mezi 180 a 380 bp. Dále byly vypočítány statistické parametry DI, PI a PIC, které potvrdily vysokou míru polymorfismu použitých SSR markerů. Byl sestaven dendrogram, který poukázal na vztahy mezi jednotlivými odrůdami mrkve. Výsledky byly porovnány s odbornými publikacemi, zabývajícími se stejnou, nebo velmi podobnou problematikou.

Klíčová slova: genetická diverzita, *Daucus carota L.*, SSR markery, polymorfismus DNA

ABSTRACT

This work is focused on theoretical and practical study of genetic diversity in carrots species. The aim of this work was to analyze the DNA polymorphism in *Daucus carota L.* by using molecular biology methods based on DNA isolation, PCR and electrophoretic separation. A total of 20 samples were analyzed by using 10 microsatellite markers. It was detected a 50 alleles with an average of five alleles per locus and alleles size between 180 and 380 bp. Further were calculated statistical parameters DI, PI and PIC, which confirmed the high value of polymorphism of used SSR markers. Dendrogram was compiled, identifying the relationships between different varieties of carrots. The results were compared with scientific publications dealing with the same or very similar problems.

Key words: genetic diversity, *Daucus carota L.*, SSR markers, polymorphism of DNA

Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Mrkev obecná (<i>Daucus carota</i>)	11
3.1.1	Morfologická charakteristika a systematické zařazení	11
3.1.2	Historie a rozšíření.....	12
3.1.3	Rozdělení odrůd.....	13
3.1.4	Obsahové látky, nutriční hodnoty a význam mrkve	14
3.2	Genetický polymorfismus a DNA markery	15
3.2.1	Mikrosatelity	18
3.3	Využití SSR markerů při studiu variability rodu <i>Daucus</i>	18
4	MATERIÁL A METODIKA.....	20
4.1	Materiál	20
4.2	Metodika	21
4.2.1	Izolace DNA z rostlinného materiálu	21
4.2.2	Polymerázová řetězová reakce.....	22
4.2.3	Agarózová gelová elektroforéza	24
4.2.4	Polyakrylamidová gelová elektroforéza	25
4.2.5	Vyhodnocení výsledků	28
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5.1	Analýzy DNA z listů a z kořenů	29
5.2	Vyhodnocení analýz jednotlivých mikrosatelitů.....	29
5.3	Genetická diverzita.....	31
6	ZÁVĚR	33
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
8	Seznam obrázků.....	39

9 Seznam tabulek 40

1 ÚVOD

Mrkev obecná (*Daucus carota L.*) je jednou z nejvýznamnějších kulturně pěstovaných plodin světa. Lidmi je pěstována už po tisíce let a po mnoho let je také předmětem šlechtění. Jako kořenová zelenina je neodmyslitelnou součástí našeho jídelníčku již od raného dětství. Významnou hodnotu ve stravě má především díky vysokému obsahu beta-karotenu, což je provitamin A, lykopenu a dalších látek nezbytných pro lidský organismus a ceněných zvláště pro své antioxidační účinky a všestrannou podporu zdraví. Bývá pěstována také krmná odrůda mrkve jako důležitá součást krmiv pro hospodářská zvířata. Nejznámější odrůda mrkve má oranžovou barvu kořene a kuželovitý tvar kořene, existuje však pestrá škála odrůd s různě zbarvenými kořeny, od bílé, přes žlutou až po tmavě fialovou, či dokonce černou. Tvary kořenů mohou být také rozmanité, například velmi tenké dlouhé, nebo naopak téměř kulovité. Velmi vysoká rozmanitost odrůd mrkve obecné je způsobena možností volného křížení mezi planými a kulturními odrůdami a také snahou člověka již po mnoho staletí šlechtit stále nové odrůdy.

Tato práce je zaměřena právě na studium diverzity odrůd mrkve obecné na úrovni polymorfismu DNA. Využívá moderních metod molekulární biologie, zejména metodu studia polymorfismu DNA pomocí mikrosatelitních markerů. Mikrosatelity jsou jednou z nejrozšířenějších metod využívaných v dnešní době ke studiu genetické diverzity mrkve, společně s metodami AFLP, nebo FISH.

2 CÍL PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma studium genetické variability a diverzity u rostlin se zaměřením na mrkev obecnou (*Daucus carota*)
- Izolace genomické DNA vybraných genotypů mrkve.
- Analýza polymorfizmu DNA pomocí metod molekulárními biologie, které jsou založeny na principu PCR a následná separace amplifikované DNA pomocí gelové elektroforézy
- Vyhodnocení a interpretace dosažených výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Mrkev obecná (*Daucus carota*)

Mrkev je rostlina z čeledi miříkovitých (*Apiaceae*), pěstovaná jako kořenová zelenina. Je cenná především vysokým obsahem provitaminu A, vitamínů B1, B2, PP a mnohými minerálními látkami (www.kvetenacr.cz). Mrkev je naší nejvýznamnější kořenovou zeleninou, patří spolu s cibulí, zahradním hrachem, okurkami nakladačkami, rajčaty a zelím mezi šest našich nejvýznamnějších zelenin s plochou nad 1000ha. Plocha mrkve byla v roce 2015 1052ha s produkcí 27 737t. (Situační a výhledová zpráva 2015). Velice významná je její produkce i ve světě, kde dosáhla v roce 2010 33,7 milionů tun sklizených z 1,16 milionu ha (Maksylewicz, Baranski, 2013).

3.1.1 Morfologická charakteristika a systematické zařazení

Mrkev je dvouletá, 20–70 cm vysoká bylina. Čepel přízemních a dolních lodyžních listů v obrysu trojúhelníkovitá až vejčitá, 2–3x lichozpeřená, střední a horní lodyžní listy v obrysu podlouhlé, vejčité nebo trojúhelníkovité, 1–2x zpeřené. Okolíčky skládající se z 20–40 okolíčků, listeny obalu většinou kratší než stopky okolíčků, listeny obalíčků čárkovité. Kališní cípy malé, trojúhelníkovité, korunní lístky bílé, obvejčité, na vrcholu hluboce vykrojené, okrajové květy paprskující. Centrální květ okolíku bývá často fialový. Po odkvětu se okolíčky k sobě nakloní. Plodem je dvounažka (www.kvetenacr.cz).

Čeleď *Apiaceae* obsahuje 455 rodů a více než 3500 druhů rostlin a je jedním z největších rodů krytosemenných rostlin (Pimenov, Leonov, 1993). Tradiční taxonomické charakteristiky v obrovské komplexní čeledi *Apiaceae* a její podčeledi *Apoidea*, do které patří rod *Daucus*, byly matoucí a žádný klasifikační systém této podčeledi nebyl dlouhou dobu všeobecně přijat (Plunkett et al., 1996). Spalik et al. (2010) provedl biogeografickou analýzu rodu *Daucus*. *Daucus carota* L. *subsp. carota* je nejznámější druh mrkve rostoucí ve volné přírodě. Pěstovaná mrkev, *Daucus carota* L. *subsp. sativus*, byl první domestikovaný druh mrkve z populací divokých mrkví *Daucus carota subsp. carota* ze střední Asie. Taxonomie *Daucus carota* L. je problematická kvůli rozsáhlému experimentálnímu křížení a spontánnímu křížení s komerčními odrůdami dalších poddruhů. Lepší pochopení hranic tohoto druhu a

fylogenetických vztahů rodu *Daucus* bude hrát klíčovou roli v budoucích šlechtitelských programech (Arbizu et al., 2014).

3.1.2 Historie a rozšíření

Mrkev jako zelenina byla využívána již před mnoha tisíci lety. Ve švýcarských neolitických pilotových stavbách byla například nalezena semena mrkve, která pocházejí z doby 2000 let před Kristem. Skutečně domácí a ve velkém měřítku se pěstovala ve střední Evropě teprve ve středověku. Teolog a přírodovědec Albertus Magnus zmiňuje ve 12. století mrkev ve svých spisech jako *daucus*, její první známé vyobrazení pochází z roku 1571 a je od P. A. Matthioliho. Divoké formy mrkve rostou v jižní Evropě a Asii – vlast mrkve se podle toho rozprostírá na velmi rozsáhlém území. Již v antice byla mrkev oceňována jako hodnotný druh zeleniny a rovněž jako léčivá rostlina (Carlsson, 2003).

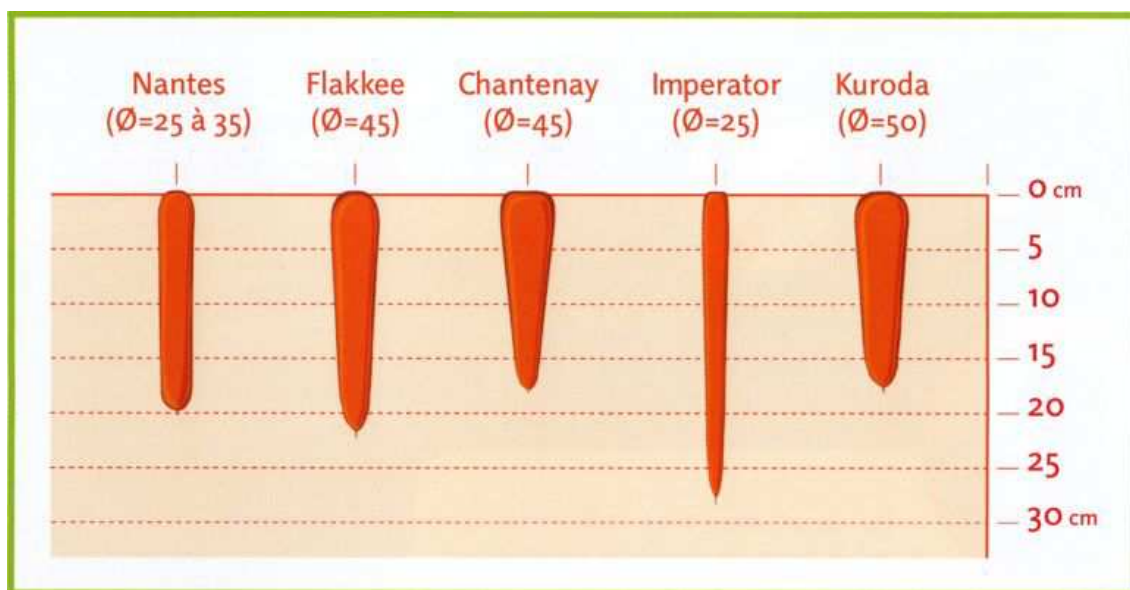
Za centrum původu mrkve je považována Střední Asie. Z primitivních mrkví se žlutými a purpurovými kořeny vyvinuly moderní jedlé mrkve, členěny na východní a západní typy, které se liší hlavně v morfologii listů a kořenů, barvě a tvaru. Domestikace mrkve, řízená selekce a šlechtitelské programy, měli za následek vývoj nových odrůd, lišících se od původních divokých mrkví hlavně v morfologických znacích kořene, toleranci vůči chorobám a škůdcům a v chemickém složení. Tyto moderní vlastnosti jsou charakteristické pro mrkve s oranžově zbarvenými kořeny, které obsahují vysokou úroveň beta-karotenu a je jedním z hlavních zdrojů provitamínu A v lidské stravě (Maksylewicz, Baranski, 2013).

Původní divoká mrkev je přímým předkem dnešní kultivované mrkve, patří ke stejnému rodu (*Daucus*), a proto se mohou mezi sebou snadno křížit. Nizozemí v 17. nebo na počátku 18. století bylo hlavním centrem pěstování mrkve. Bylo zde pozorováno, že pyl z květů volně rostoucí divoké mrkve se může dostat do přilehlého pole a „znečistit“ tak semena komerčně pěstovaných mrkví. Spontánní křížení mezi divokou mrkví a dřívější domestikovanou žlutou a bílou formou mrkve zapříčinilo vznik první západní mrkve s oranžově zbarvenými kořeny. Bylo zjištěno, že volně rostoucí mrkve přilehlé k polím s kultivovanou mrkví, měly průměrnou kombinaci morfologických vlastností

divokých a kultivovaných rostlin, což naznačuje, že křížení proběhlo právě u těchto dvou druhů mrkve (Rong et al., 2010)

3.1.3 Rozdělení odrůd

V dnešní době jsou odrůdy mrkve rozdělovány různými způsoby, podle různých kritérií. V současnosti existuje několik set odrůd členěných podle různých typologií (www.carrotmuseum.co.uk). Obrázek č. 1 ukazuje základní rozdělení odrůd mrkve podle velikosti a tvaru kořene.



Obrázek 1: Základní rozdělení odrůd mrkve (upraveno podle <http://www.carrotmuseum.co.uk/>)

Typ „Flakee“ má velmi dlouhé, kónicky zúžené kořeny s širokou plochou hlavou, nejčastěji pěstován ve východní Evropě. Typ „Chantenay“ má kratší kořen kónického tvaru a je populární ve Francii a v Jižní Americe. Typ „Nantes“ je pěstován nejčastěji – je to typická karotka (asi 50% objemu světové produkce). Typ „Kurdoa“ má krátký kulatý kořen, pěstovaný hlavně v Asii. Typy s delšími a užšími kořeny, jako je „Imperator“, preferují v Severní Americe (www.carrotmuseum.co.uk) a (www.zemedelskekomodity.cz).

Často se mezi širokou veřejností zmiňují dva názvy mrkve, a to mrkev a karotka. Z pěstitelského hlediska jde o rozdíl v ranosti. Karotka je označení pro rané odrůdy, určené k okamžité spotřebě a jako mrkev bývají označovány pozdnější odrůdy, vhodné k uskladnění. Z botanického hlediska jsou karotka a mrkev to samé, ne ale z hlediska tržního hospodářství a ve vztahu k

průmyslovému zpracování. Zde se odrůdy přesně rozlišují podle tvaru. Krátké, zaoblené odrůdy s tupým koncem a kulovitými kořeny se nazývají karotka, odrůdy s polodlouhými kořeny vyběhajícími ve špičku naproti tomu mrkev. Existuje ale rovněž mnoho tvarů mezi oběma uvedenými (Carlsson, 2003).

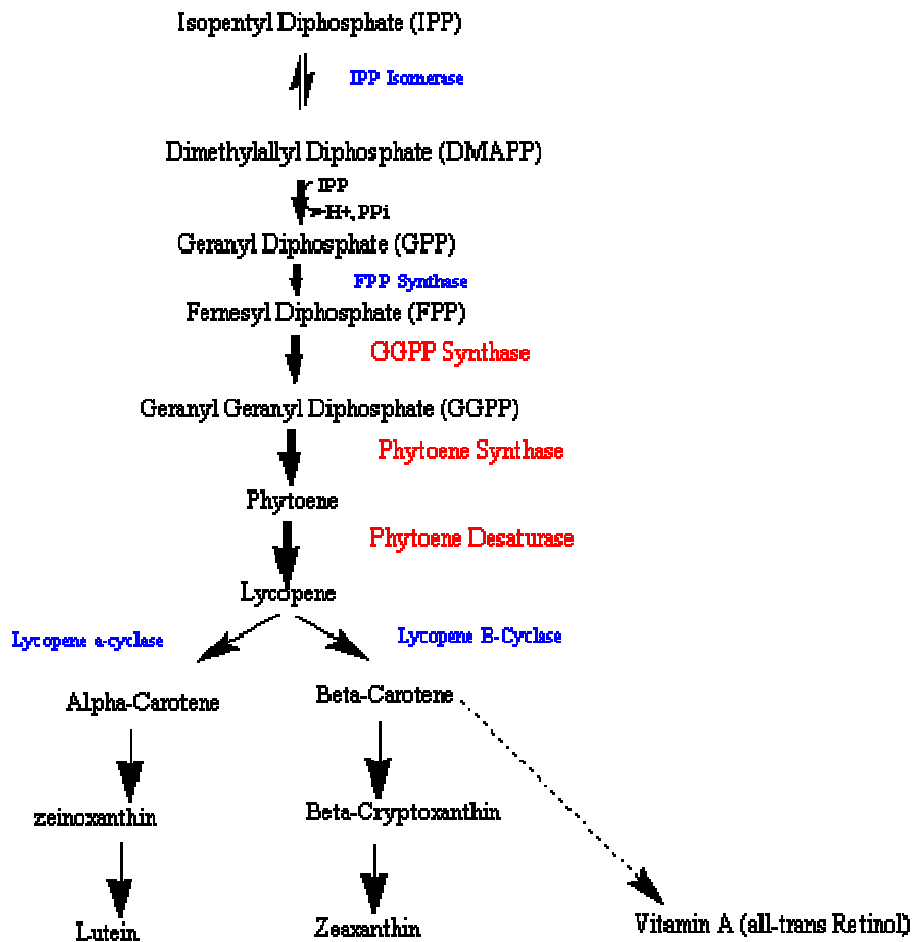
Další rozdělení odrůd mrkve je na základě dvou samostatných genofondů podle oblasti, kde byla domestikována. První genofond je mnohem rozmanitější, zahrnuje skupinu odrůd východního typu (Eastern), které pochází především z Asie a druhý genofond západního typu (Western), který zahrnuje odrůdy z Evropy, USA a Japonska (Maksylewicz, Baranski, 2013).

3.1.4 Obsahové látky, nutriční hodnoty a význam mrkve

Oranžové mrkve mají podstatný význam v lidské výživě a jsou běžně pěstované v Evropě a USA, ale kořeny mrkve mohou mít i jiné barvy, jako je červená, žlutá nebo fialová. Takto zbarvené kořeny mrkve jsou taktéž bohaté na živiny a látky podporující zdraví lidského organismu, včetně karotenoidů jako je lutein nebo lykopen, fenoly a polyacetyleny, které vykazují vysokou antioxidační aktivitu a zbavování se volných kyslíkových radikálů. Ukázaly se jako cenné látky v prevenci rakoviny, srdečních onemocnění a nemocí souvisejících s věkem (Maksylewicz, Baranski, 2013).

Jezení syrové mrkve nám přinese pouze poloviční užitek. Karoten ze syrové stravy přijme tělo pouze asi z 1%, neboť beta-karoten se vyskytuje v buňkách v krystalické formě a je obklopen pevnou, nestravitelnou buněčnou stěnou. Když se buněčný obal uvolní nebo rozruší nastroháním, pokrájením na malé kousky, odšťavněním anebo mírným zahřátím a přidá se malé množství tuku, využití karotenu se optimalizuje (Carlsson, 2003).

Karotenoidy představují širokou skupinu pigmentů, které jsou všudypřítomné v celé přírodě. Mrkev obecná představuje důležitý zdroj beta-karotenu (provitaminu A), alfa-karotenu a luteinu (Jayaraj et al. 2008). Nejvyšší akumulace beta-karotenu a alfa-karotenu je v zásobních kořenech a v listech mrkve (Moreno et al., 2013). Syntetické dráhy karotenoidů v mrkvi jsou zobrazeny na obrázku č. 2.



Obrázek 2: Syntetická dráha karotenoidů (<http://cbc.arizona.edu>)

3.2 Genetický polymorfismus a DNA markery

Polymorfní gen je takový gen, u kterého se v jednom lokusu vyskytují minimálně dvě různé alely (varianty genu). Molekulární markery jsou ve velké míře využívány ke studiu genetického polymorfismu.

Molekulární markery jsou zařazovány do dvou hlavních skupin, a to na markery biochemické a DNA (Deoxyribonukleová kyselina), případně RNA (Ribonukleová kyselina) markery. DNA markery jsou neutrální a jsou nezávislé na jakýchkoliv environmentálních podnětech nebo na vývojovém stádiu (časově a prostorově nezávislá), mají tudíž obrovskou výhodu oproti biochemickým markerům při analýzách genetické diverzity. Podle metod mohou být DNA markery dále děleny do dvou skupin, v první skupině jsou metody na bázi hybridizace a v druhé skupině na bázi PCR (Polymerázová řetězová reakce). Přehled a srovnání metod s využitím DNA markerů je zobrazen v tabulce č. 1.

Lze rozlišit dvě oblasti využití markerů. První je založena na využití DNA markerů pro stanovení genetických vztahů. Tyto aplikace zahrnují identifikaci odrůdy s možností využití pro ochranu práv pro pěstitele, nebo například stanovení rodičovství. Druhá oblast je založena na použití genetických markerů pro identifikaci a mapování lokusů kvantitativních znaků a sledování těchto lokusů během transgenozy nebo šlechtitelských programů (Soller, Beckmann, 1983). DNA markery začaly být využívány jako vhodné prostředky pro rychlou a detailní genetickou analýzu vyšších organismů. Velmi rozšířené použití DNA markerů je ve výstavbě genetických map, díky kterým může být například stanoveno umístění genů na chromozomech, ovlivňující jednoduché, nebo složité znaky. Další využití genetických markerů je rozpoznávání evolučních vztahů uvnitř i mezi jednotlivými druhy, rody, nebo většími taxonomickými seskupeními. Tyto studie zahrnují zkoumání podobností a rozdílů mezi jednotlivými taxony s použitím řady DNA markerů (Paterson et al., 1991).

Tabulka č. 1: Srovnání metod využívajících DNA markery (upraveno podle Sarwat et al., 2011)

Parametry/ metoda	RFLP	SSR	CAPS	EST	RAPD	AFLP
Dostupnost	omezená	průměrná	průměrná	průměrná	neomezená	neomezená
Stupeň polymorfismu	nízký až střední	střední až vysoký	střední	střední	vysoký	vysoký
Spolehlivost	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká	nízká	vysoká
Potřebné znalosti	vysoké	vysoké	nízké	nízké	nízké	střední až vysoké
Náklady na vývoj	vysoké	střední	střední	střední	nízké	střední
Náklady na provoz	vysoké	střední	nízké	nízké	nízké	nízké
Radioaktivní látky	ano	ano	ne	ne	ne	ano/ne
Množství DNA na experiment	vysoké (5-10 µg)	vysoké (3-5 µg)	nízké (100 ng)	nízké (100 ng)	nízké (25 ng)	střední (250 ng)
Kvalita (čistota) DNA	vysoká	vysoká	nízká	nízká	střední až vysoká	vysoká
Možnosti automatizace	žádné	žádné	částečné	částečné	částečné	částečné
Typ markeru	kodominantní	dominantní	kodominantní	kodominantní	dominantní	dominantní
Počet lokusů	jeden	více	jeden	jeden	více	Více
Využití	mapování genomu, evoluční mapování, genetická diverzita	genetická diverzita	genové mapování	genové mapování	genetická diverzita a značení pomocí BSA	genetická diverzita a značení pomocí BSA

Vysvětlivky: RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism, SSR- Single Sequence Repeats, CAPS- Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, EST- expressed sequence tag, RAPD Bovine Serum Albumin - Random amplified polymorphic DNA, AFLP- Amplified Fragment Length Polymorphism, BSA-Bovine Serum Albumin.

3.2.1 Mikrosatelity

Mikrosatelitní markery (SSR) jsou tandemově se opakující úseky DNA složené z 1-6 párů bazí (bp), (Tóth et al., 2000). Tyto tandemové repetice mutují velice vysokou rychlostí, 10^3 až 10^7 mutací na lokus za generaci (Buschiazzo, Gemmell, 2006). Proto může být počet repetic mezi jednotlivými genotypy velice variabilní, což činí z SSRs vysoce polymorfní markery, užitečné pro genetické analýzy. Obecně platí, že vyšší počet repetic je spojen s větší genotypovou variabilitou a kratší motivy (např. dinukleotidy) mají obvykle více opakování než delší motivy (např. tetranukleotidy), (Zalapa et al., 2012). Mikrosatelity lze nalézt kdekoli v genomu, a to jak v kódujících, tak i nekódujících oblastech. Vzhledem k jejich vysoké proměnlivosti je pravděpodobné, že hrají významnou roli v evoluci genomu, při vytváření a udržování kvantitativní genetické variability (Tautz et al 1986; Kashi et al 1997). Kromě toho, koreluje obsah mikrosatelitů v genomu s celkovou velikostí genomu organismů (Hancock, 1996).

SSR markery jsou velice nestabilní. Tuto vlastnost vysvětlují dvě příčiny, a to „prokluzování“ DNA polymerázy a nerovnoměrná rekombinace (Tóth et al., 2000).

Jedna z nejdůležitějších vlastností SSR markerů je, že mohou detekovat více alel v jednom lokusu (až 10 alel v populaci). Tato hypervariabilita dělá z SSRs více informativní markery, než Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markery, které jsou zpravidla bialelické (Hamblin et al., 2007).

3.3 Využití SSR markerů při studiu variability rodu *Daucus*

Počet haploidní sady chromozomů pro rod *Daucus* se pohybuje v rozmezí $n=9$ po $n=11$. Diploidní sady pak v rozmezí $2n=18$, 20 a 22. Byly také zjištěny dva tetraploidní druhy (Grzebelus et al., 2011). Velikost haploidního genomu mrkve se odhaduje na 473 Mbp (Arumuganathan, Earle, 1991).

Popis variability rodu *Daucus* byl nejdříve proveden pouze na základě morfologických charakteristik. Novější metody založené na DNA markerech, jako jsou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), umožnily rozlišení mezi divokými a domestikovanými formami *Daucus carota*,

což umožnilo genetickou analýzu biodiverzity. SSR metoda založená na DNA markerech je využívána při posuzování genetické variability u mnoha rostlinných druhů. V nedávné době byly identifikovány nové SSR markery v mrkvi a byly použity pro vyhodnocení genofondu u mrkve, což vedlo k identifikaci dvou samostatných genofondů podle zeměpisného původu na východní a západní typ. Cílem současného výzkumu je charakterizovat intrapopulační variabilitu mrkve za použití SSR metod a ověřit předchozí závěry, týkající se východně-západní struktury genofondu mrkve (Maksylewicz, Baranski, 2013).

Nogales et al. (2016), provedli analýzu intronu 1 genu *cAOX1*, jenž je genem pro alternativní oxidázu (AOX), která je klíčovým enzymem alternativní respirační dráhy a podílí se na odpovědi rostlin na stres z prostředí. Analýza umožnila diferenciaci hlavních skupin genotypů mrkve (které byly většinou domestikované a většinou příbuzné s planým typem) a také pomohla najít důkazy o „out-crossingu“ mezi kultivovanou mrkví a planou mrkví. Polymorfismus nalezený v této intronové oblasti, zejména v oblasti SSR, má potenciál být dobrým zdrojem variability k vývoji molekulárních markerů, buď pro šlechtění mrkví na toleranci ke stresu, nebo pro studium diverzity.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

Původní materiál činil 30 vzorků mrkve, které poskytla firma SEMO a.s. Smržice (Ing. Jan Prášil), ukázkou z kolekce je možné vidět na obrázku č. 2, po stanovení obsahu beta-karotenu a lykopenu bylo vybráno 20 vzorků, které sloužily jako výchozí materiál k experimentu (tabulka 2). Vybrané vzorky sestávaly z devíti linií, pěti F1 hybridů a šesti klasických odrůd. V experimentu byla použita nejprve DNA izolovaná z listů a poté DNA izolovaná z kořenů mrkve.



Obrázek 3: Ukázka z kolekce vzorků mrkve

Tabulka 2: Seznam odrůd použitých v experimentu.

Pořadí	Charakter	Název
1.	Linie	<i>Ps3</i>
2.	Linie	<i>Ps3</i>
3.	Linie	<i>Ps20</i>
4.	Linie	<i>Ps20</i>
5.	Linie	<i>Nanrub</i>
6.	Linie	<i>Maxika</i>
7.	Linie	<i>Kráska/Nantes</i>
8.	F1 hybrid	<i>Jarana F1</i>
9.	F1 hybrid	<i>Jolana F1</i>
10.	F1 hybrid	<i>Jitka F1</i>
11.	F1 hybrid	<i>Koloseum F1</i>
12.	klasická odrůda	<i>Marquette</i>
13.	F1 hybrid	<i>Fire wedge F1</i>
14.	klasická odrůda	<i>Desi Red</i>
15.	klasická odrůda	<i>Karkulka</i>
16.	klasická odrůda	<i>Kráska</i>
17.	klasická odrůda	<i>Katlen</i>
18.	klasická odrůda	<i>Rubína</i>
19.	klasická odrůda	<i>Kardila</i>
20.	klasická odrůda	<i>Nantes 3</i>

4.2 Metodika

V experimentu byly provedeny následující kroky:

- Izolace DNA z rostlinného materiálu
- Polymerázová řetězová reakce
- Kontrola PCR produktů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu
- Vizualizace výsledků PCR reakce pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu
- Vyhodnocení výsledků

4.2.1 Izolace DNA z rostlinného materiálu

Navážka 100 mg rostlinného materiálu jak z listů, tak z kořenů byla homogenizována pomocí tekutého dusíku a DNA byla izolována pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) podle příslušného návodu (www.qiagen.com). Následně byla změřena koncentrace a čistota extrahované genomické DNA na

přístroji Picodrop Spectrometr PICO100 (PicodropTM). Koncentrace (ng/μl) i čistota byly vyhodnoceny jako dostatečné pro pokračování dalších analýz.

4.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Nejprve byla do reakční směsi pro PCR použita DNA izolovaná z listů mrkve a 13 mikrosatelitních markerů a poté DNA izolovaná z kořenů mrkve s 10 novými mikrosatelitními markery. Seznamy markerů použitých od všech autorů jsou zaznamenány v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3: Charakteristika markerů použitých v experimentu - první část (Rong et al. 2010)

Název SSR	Opakující se motiv	M13 - tailed Forward primer Reverse primer	Optimální teplota annealingu
1-3C	(ACAT)n	CACGACGTTGTAAAACGAC ACG AAGG GAG AAT GAT GA	55
1-5E	(AG)n	CACGACGTTGTAAAACGAC CTT CCA TCT CCT TCA CTC	50
1-7C	(AC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC CCC TCT ACT TTC AAA TTA GTC	48
1-9C	(AG)n	CACGACGTTGTAAAACGAC GCT GGG GAT CAA TAA TTT	45
1-12A	(AC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC TGG AAG TGG TGT TGA TTA C	50
1-12E	(AC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC ATA AGA TGC AAA GTA TGT AAT A	50
1-12F	(AC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC CAA AGT TTC AAG AAC AAT ATC	53
2-3G	(AAC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC CCC GAG TAA TTT AGT GTC AG	51
2-6C	(ACAT)n	CACGACGTTGTAAAACGAC AAC ATC ACA TGA AGC ATT AT	48
2-7A	(ACC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC AAG ACG ATG TTG ATG A TA ATA GT	55
2-10C	(ATC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC CAC TCT CTC CAC TGA AAC TAT	48
2-10H	(ATC)n	CACGACGTTGTAAAACGAC CGG AAG AGG AGC TGT AA	48

Tabulka 4: Charakteristika markerů použitých v experimentu - druhá část (Cavagnaro et al. 2011)

Název SSR	SSR - motiv	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')	Optimální teplota annealingu	Velikost (bp)
GSSR-4	(TCTA) ₂₁	CAATCTTGCCACTAAAAGAGCA CAGATACAATAGACAGGAAACATCG	55	314
GSSR-6	(TC) _{9a} (CT) ₁₁ (CAGTAG) ₄	TCTCCTCTTGATTCTTCTTCGC CCAATAAGCGTAAGCGTTTCTC	57	306
GSSR-9	(TG) _{13ata} (TATG) _{10gatgg} (ATGT) ₃	TTGACGCTGTAGTCGCACTTAT CAGCAAATCAGAGGAAGGGTAG	54	316
GSSR-14	(AC) ₁₀ (AG) ₁₈	CCACCTTGGACAAAGCAAAC GCCCAGTCTTCTTAATTGCAG	55	224
GSSR-16	(TG) _{9tacgc} (ATGT) ₃	ATGCAAACGACAATATCCACAG GCCCAGCCACTTCCTAGAT	57	212
GSSR-31	(CAA) ₃ (GTTT) ₈	GGATTCTAACTGGCCTCAAACA TGTATAATTCGCAACAAAGGC	54	381
GSSR-85	(TCTA) _{4ttatca} (ATCT) _{4gtctgtcta} (TCTG) ₃	TGACTCGGTGGATGAATTAAGA CACTGCTTTGCCATTGTTTT	58	227
GSSR-91	(TATG) ₅	ATTCACCTTCAGTGCCTCCTAA GAATTGTGTGTGGTGCCTTCTA	55	244
GSSR-107	(ATAC) ₈ (ACAT) ₄	TTCTGGTCTTTTGACATGAAGG CGGATTTGAGGTGAGTTGAATA	54	265
GSSR-138	(GT) _{5ata} (GT) ₇ (AG) ₂₁	CGCTCGAGTTTCGTAGAGT CCTCCCAACTCAATCCAAT	56	519

Reakční směs pro PCR vznikla smícháním složek reakce, které jsou uvedeny v tabulce č. 5, rozdělením do mikrozkušavek po 24 µl a přidáním jednoho µl izolované DNA. Zkušavky byly pečlivě uzavřeny a vloženy do termocyklieru T3 (Biometra) a následně byl nastaven příslušný program.

Pro první sadu primerů PCR program zahrnoval 5 minut iniciaci denaturace při 94°C, následovanou cyklem: 1 minuta při 94°C, 1 minuta nasedání primerů (annealing) při teplotě, která byla specifická pro každou primerovou kombinaci (teploty jsou zaznamenány v tabulce č. 3) a 1 minuta při 72°C. Cyklus měl 40 opakování. Polymerázová řetězová reakce byla ukončena 10 minutami při 72°C. Pro druhou sadu primerů byl termocykler naprogramován na 3 minuty při 94°C pro iniciaci denaturace, následovanou 40 cykly 20 sekund při 94°C, 1 minuty nasedání primerů (annealing) při teplotě, která byla pro každou primerovou kombinaci specifická (teploty jsou zaznamenány v tabulce č. 4) a 1 minuty při 72°C. Reakce byla ukončena závěrečným krokem 5 minut při 72°C.

Tabulka 5: Seznam složek mastermixu pro PCR

Chemikálie	Objem v jedné mikrozkušavce (μl)
Deionizovaná destilovaná voda	16,8
Pufř	5
dNTP	0,1
Forward primer	1
Reverse primer	1
Taq polymeráza	0,1
Celkem:	24

4.2.3 Agarózová gelová elektroforéza

Po skončení PCR a vyjmutí zkumavek z termocyklu, byla amplifikovaná DNA separována a vizualizována pomocí elektroforézy na agarózovém gelu pro kontrolu úspěšnosti PCR.

Byla sestavena vanička pro elektroforetický gel s plastovými hřebeny pro tvorbu jamek v gelu, ten byl poté připraven postupným přidáváním chemikálií, uvedených v tabulce č. 6. Nejprve bylo odměřeno 1891,5 ml destilované vody, do které bylo přidáno 38,5 ml 50x koncentrovaného tris-acetátového pufru (TAE). Z tohoto zásobního roztoku bylo do skleněné odměrky odlito 270 ml a přidáno 4,2 g agarózy. Směs byla promíchána, vložena do mikrovlnné trouby na 3-5 minut a přivedena k varu, aby se agaróza v roztoku zcela rozpustila. Po vyjmutí odměrky z mikrovlnné trouby byl roztok ochlazen proudem studené vody a v digestoři do něj byly přidány 2 μl ethidium bromidu s koncentrací 10 mg/ml a obsah odměrky byl nalit do připravené vaničky, do které se poté vložily plastové hřebeny. V digestoři gel tuhnul 20-30 minut, poté byly odstraněny hřebeny, gel byl vyjmut z vaničky, přesunut do elektroforetické aparatury Agagel Maxi (Biometra) a zalit zbytkem zásobního roztoku TAE. Do vytvořených jamek bylo napipetováno 8 μl amplifikované DNA, aparatura byla zavřena ochranným krytem a elektroforéza byla spuštěna při 80 V stejnosměrného napětí po dobu přibližně 1,5 hodiny.

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a separovaná DNA byla vizualizovaná pod UV světlem pomocí transluminátoru Ultraviolet (Ultra. Lum. Inc.).

Tabulka 6: Seznam složek agarózového gelu

Chemikálie	Objem
Destilovaná voda	1891,5ml
TAE (tris-acetátový pufr) 50x	38,5ml
Agaróza (Serva, USA)	4,2g
Etidium bromid (Serva, USA)	2 μ l

4.2.4 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Pomocí vertikální elektroforézy na polyakrylamidovém gelu byly separovány amplifikované fragmenty DNA na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Nejprve byla připravena skla pro nalití gelu, která se pečlivě omyla a očistila etanolem, poté se mezi pár skel vložilo těsnění, připevnila se dohromady plastovými svorkami a takto poskládaná skla se postavila do vertikální polohy, připravena k nalití gelu. Příprava polyakrylamidového gelu spočívala v umístění magnetického míchadla do skleněné odměrky a postupném přidávání chemikálií, zaznamenaných v tabulce č. 7 v přesně stanoveném pořadí, nejprve destilovaná voda, 10x koncentrovaný TBE pufr (trisbáze (trihydroxymethyl-diaminomethan; Biotech), kyselina boritá, disosium; Biotech), AKRYL/BIS (akrylamid/biskrylamid) v poměru 19:1, TEMED (tetramethylendiamin; Biotech) a těsně před nalitím gelu byl přidán APS (persíran amonný; Biotech), po jehož přidání začal roztok okamžitě polymerovat. Gel byl rychle přelit do připravených skel, byly do něj umístěny plastové hřebeny pro vytvoření jamek a nechal se tuhnout 20-30 minut.

Tabulka 7: Seznam složek polyakrylamidového gelu

Chemikálie	Použité množství
Destilovaná voda	34,650 ml
TBE (10x)	5ml
AKRYL/BIS	10ml
TEMED	334 μ l
APS	334 μ l

Během tuhnutí gelu byla připravena aparatura pro vertikální elektroforézu a roztok elektrolytu, jehož složky jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka 8: Složení elektrolytu pro polyakrylamidovou elektroforézu

Chemikálie	Použité množství
Destilovaná voda	900 ml
TBE (10x)	100 ml

Po ztuhnutí gelu byly vyjmuty plastové hřebeny a do vzniklých jamek byl nalit elektrolyt, většinou do druhé a poslední jamky byl napipetován velikostní standard (DNA ladder) a do ostatních jamek byly postupně napipetovány amplifikované vzorky DNA. Ze skel byly odstraněny svorky, vyjmuta silikonové těsnění, byla po dvou vložena do elektroforézové aparatury a zalita zbytkem elektrolytu. Aparatura byla uzavřena ochranným víkem a byla spuštěna elektroforéza, která se dělila na dva kroky. V prvním kroku bylo spuštěno stejnosměrné napětí o velikosti 120 V po dobu 10 minut a v druhém kroku probíhala elektroforéza při 300 V 60 – 120 minut v závislosti na velikosti výsledných produktů.

Po ukončení elektroforézy byly gely barveny dusičnanem stříbrným (AgNO_3), jehož složení je uvedeno v tabulce č. 9. Gely byly opatrně odejmuty ze skel, přeneseny nejprve do nádoby s fixačním roztokem (složení v tabulce č. 10) a umístěny na třepačku, kde byly po dobu 1 minuty, poté byly přesunuty do nádoby s dusičnanem stříbrným a umístěny na třepačce po dobu 3 minut. Po navázání stříbra byly gely propláchnuty destilovanou vodou a umístěny do nádoby s vývojkou (složení v tabulce č. 11), která byla umístěna na třepačku a za 5 – 10 minut došlo k zviditelnění separovaných DNA fragmentů obarvených stříbrem. Nakonec byly gely umístěny do fólií, zataveny, popsány, nafoceny a uloženy do lednice, ukázka takto upraveného gelu je na obrázku č. 4.

Tabulka 9: Složení roztoku AgNO_3 pro barvení polyakrylamidového gelu

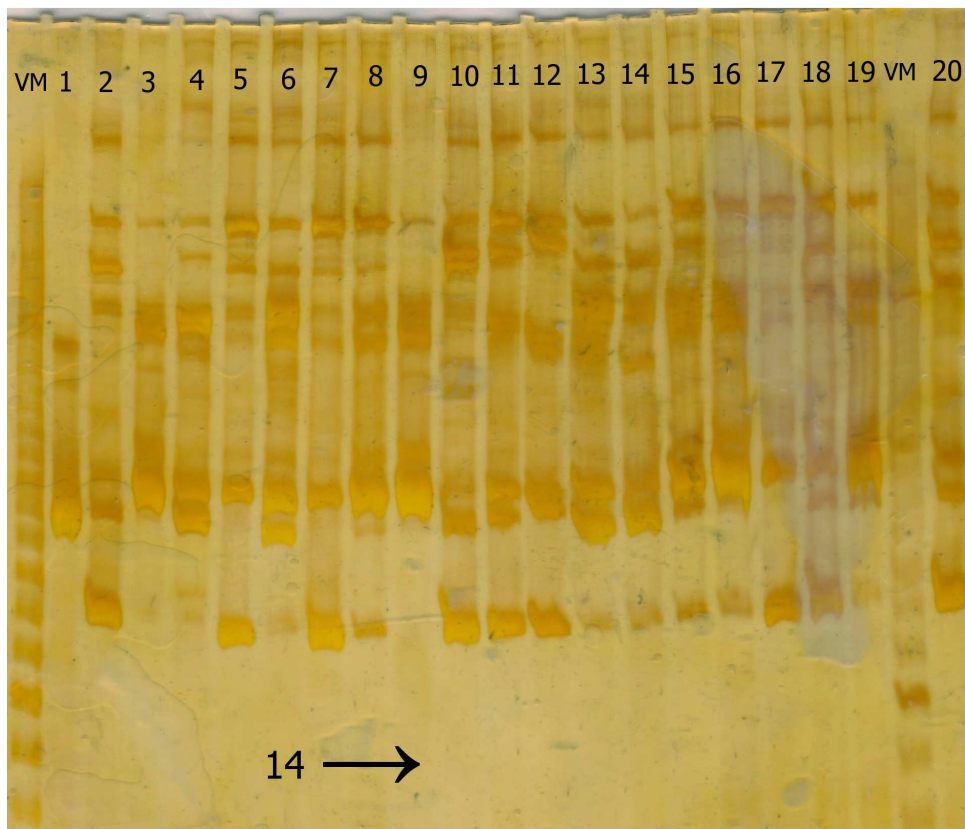
Chemikálie	Použité množství
Destilovaná voda	1000 ml
AgNO_3	2 g

Tabulka 10: Složení fixačního roztoku pro barvení polyakrylamidového gelu

Chemikálie	Použité množství
Destilovaná voda	356,4 ml
Etanol	41,6 ml
Kyselina octová	2 ml

Tabulka 11: Složení vývojky pro barvení polyakrylamidového gelu

Chemikálie	Použité množství
Destilovaná voda	730 ml
37% formaldehyd	10 ml
NaOH	22,2 g



Obrázek č. 4: Upravený polyakrylamidový gel s SSR markerem 14

Vysvětlivky: VM-velikostní standardy (DNA ladder), 1-Ps3, 2-Ps3, 3-Ps20, 4-Ps20, 5-Nanrub, 6-Maxika, 7-Kráska/Nantes, 8-Jarana, 9-Jolana, 10-Jitka, 11- Koloseum, 12-Marquette, 13-Fire wedge, 14-Desi Red, 15-Karkulka, 16-Kráska, 17-Katlen, 18-Rubína, 19-Kardila, 20-Nantes 3

4.2.5 Vyhodnocení výsledků

Podle nasnímaných polyakrylamidových gelů byla sestavena binární matice, která ukazovala na přítomnost (1) nebo nepřítomnost (0) alel. Pro každý SSR marker byly vypočítány hodnoty DI (index diverzity), PI (index pravděpodobnosti) a PIC (polymorfní informační obsah podle Russel et al. (1997)). Dále byla matice zpracována softwarem FreeTree verze 9.1 (Hampl et al., 2001) metodou párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (UPGMA) a s pomocí Jaccardova koeficientu pravděpodobnosti (Jaccard, 1908). Výstup ze softwaru FreeTree byl vizualizován pomocí dalšího softwaru TreeView verze 6.1 (Page, 1996), který vytvořil výsledný dendrogram.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýzy DNA z listů a z kořenů

Nejprve byla DNA izolovaná z listů, předpokládalo se, že v listech bude DNA ve větším množství než v kořenech, a proto budou další analýzy kvalitnější. Hodnoty koncentrace změřené na Picodropu Spectrometr PICO100 (PicodropTM), byly poměrně nízké, ale byly uznány jako dostatečné pro provedení PCR. Po provedení kontrolní agarózové elektroforézy však z 20 vzorů byly viditelné produkty pouze u 2 až 3 vzorků. Se stejnými výsledky byly provedeny elektroforézy ještě dalších čtyř mikrosatelitů a poté bylo rozhodnuto upustit od DNA z listů a zkusit ji izolovat z kořenů.

K nejčastějším problémům u téměř všech postupů izolace DNA patří přítomnost kontaminujících sloučenin ve vzorcích, zvláště RNA, proteiny, polysacharidy, polyfenoly a nejaderné DNA (Varma et al., 2007). Špatné výsledky z elektroforézy mohly být také způsobeny například chybou v postupu při přípravě mastermixu pro PCR, nebo mohly být listy mrkví napadeny nějakým patogenem.

DNA izolovaná z kořenů měla vysokou koncentraci i čistotu a agarózová elektroforéza potvrdila úspěšnost PCR. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a zbytek experimentu byl proveden s DNA extrahovanou z kořenů.

5.2 Vyhodnocení analýz jednotlivých mikrosatelitů

V experimentu bylo použito pro analýzu dvaceti vzorků mrkve 10 mikrosatelitních markerů. Všechny SSR markery byly polymorfní, nebyl zjištěn žádný uniformní marker. Celkově bylo zjištěno 50 alel, což odpovídá 5 alelám na lokus, což je poměrně malý průměr, například oproti Baranski et al. (2012), kteří popisují 7,6 alel na lokus, nebo Maksylewicz a Baranski (2013) zaznamenali dokonce 9,37 alel na lokus. Nízký počet alel na lokus může být způsobený nízkým počtem analyzovaných SSR markerů, nebo malým souborem vzorků pro analýzu. Baranski et al. (2012), ve své práci uvádí analýzu 30 SSR markerů a celkově zjištěných 227 alel z kolekce 88 druhů mrkve, ovšem z těchto dvou citovaných článků nevyplývá, že čím více markerů a vzorků mrkve, tím více identifikovaných alel na lokus, protože Maskylewicz a Baranski (2013), ve své práci analyzovali 27 SSR markerů a pouze 18 druhů mrkve. Z 10

mikrosatelitů byly nad průměrnou hodnotou markery 107, 31 a 91. Hustota mikrosatelitů v genomové DNA mrkve se odhaduje na 1,74 Mbp, což je přibližně 134,5 SSR na 1 Mbp DNA. V porovnání s jinými modelovými organismy, jako jsou například *Arabidopsis thaliana*, réva vinná, rýže, nebo topol, je tato hustota poměrně nízká (Cavagnaro et al., 2011). Velikost alel se pohybovala mezi 180 a 380 bp (tabulka 11), což odpovídá také výsledkům Cavagnaro et al. (2011), ze kterých bylo čerpáno při navrhování primerů, ve kterých jsou téměř shodné velikosti alel, pouze s malými odchylkami – 144 až 390 bp. Maskylewicz a Baranski (2013) uvádí mnohem delší fragmenty, s délkou až 540 bp.

Tabulka 12: Výsledná charakteristika SSR markerů

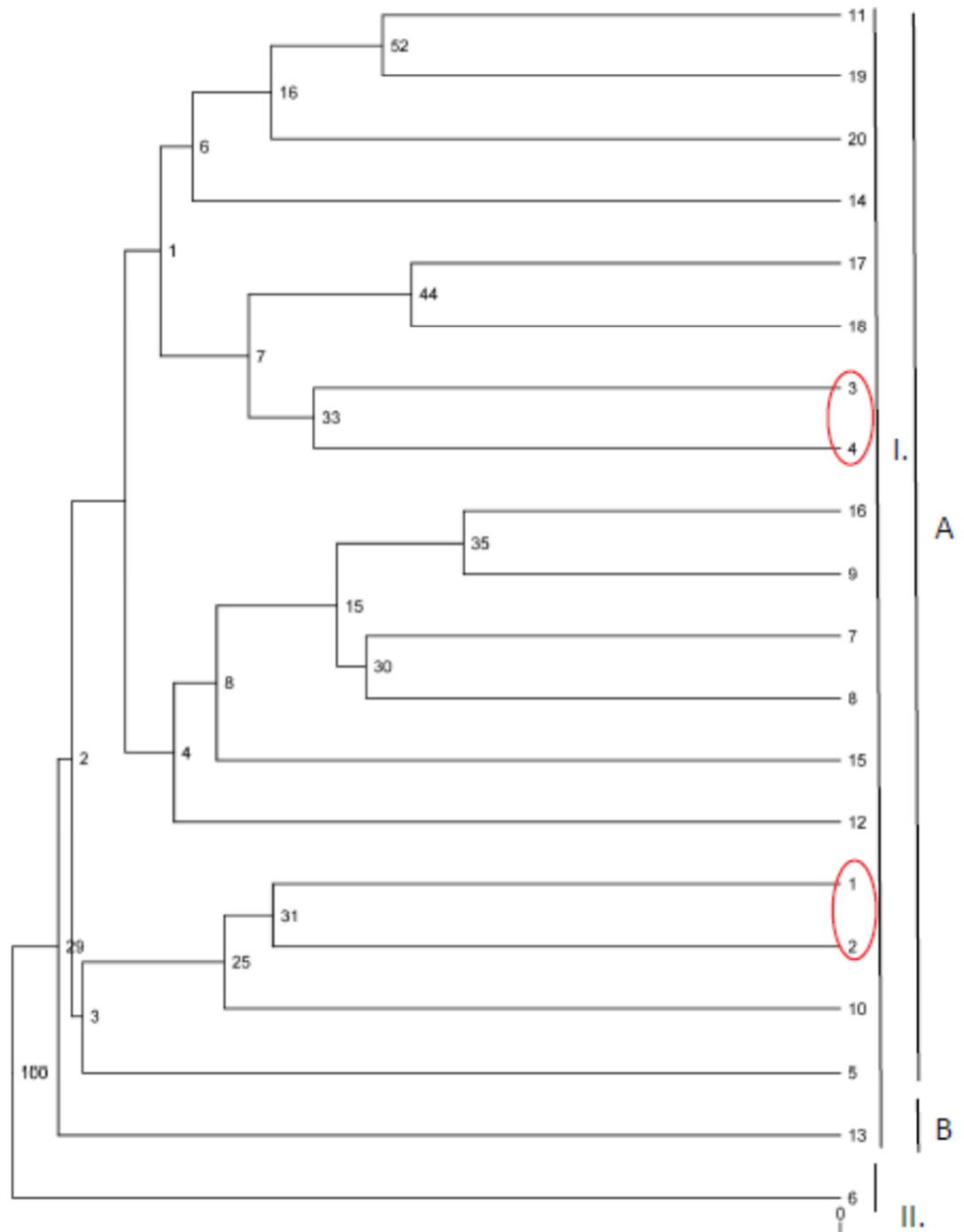
SSR	VELIKOST (bp)	POČET ALEL	DI	PI	PIC
6	260-280	4	0,738	0,090	0,705
138	260-280	4	0,848	0,026	0,839
4	220-280	5	0,885	0,012	0,881
9	260-320	4	0,809	0,040	0,795
107	240-280	6	0,916	0,008	0,913
31	320-380	6	0,885	0,016	0,880
85	180-240	5	0,867	0,018	0,860
14	280-340	5	0,854	0,019	0,852
91	200-240	7	0,936	0,004	0,935
16	200-240	4	0,799	0,052	0,780
PRŮMĚR		5	0,854	0,028	0,844

Pro jednotlivé mikrosatelity byly vypočítány statistické hodnoty DI (diversity index), PI (pravděpodobnost identity) a PIC (polymorfní informační obsah), hodnoty jsou zaznamenány v tabulce č. 11. Hodnoty PI se blížily nule, nejvíce SSR marker 91, který měl nejnižší hodnotu PI (0,004) a naopak nejvyšší hodnotu DI (0,936) a PIC (0,935), které se naopak blížily jedné. U všech mikrosatelitů byly hodnoty PIC velice vysoké, průměrná hodnota byla 0,844. Mikrosatelity s nejvyššími hodnotami PIC, a tedy nejvhodnější pro analýzy genetické variability, byly 107 a 91, které mají tyto hodnoty vyšší než 0,9 a také mají nejvyšší počet alel na lokus. Tyto zjištěné hodnoty u všech mikrosatelitů přesahují hodnoty s ostatními porovnávanými experimenty, např. Baranski et al. (2012) uvádí průměrné hodnoty dvou sledovaných skupin 0,62 a 0,53. Ve studii

Maksylewicz a Baranski (2013), kde hodnotí 18 různých populací mrkve, se hodnoty PIC pohybují mezi 0,18 a 0,48.

5.3 Genetická diverzita

Genetická diverzita a vztahy mezi jednotlivými genotypy mrkve, byly zjištěny shlukovou analýzou pomocí dendrogramu (obrázek č. 5)



Obrázek č. 5: Dendrogram genetické diverzity

Vysvětlivky k dendrogramu: I. A II. – shluky, A a B – podshluky, 1-Ps3, 2-Ps3, 3-Ps20, 4-Ps20, 5-Nanrub, 6-Maxika, 7-Kráska/Nantes, 8-Jarana, 9-Jolana, 10-Jitka, 11- Koloseum, 12-Marquette, 13-Fire wedge, 14-Desi Red, 15-Karkulka, 16-Kráska, 17-Katlen, 18-Rubína, 19-Kardila, 20-Nantes 3

20 odrůd mrkve se rozdělilo do 2 shluků, kdy se do shluku II. separovala pouze odrůda Maxika, což byla linie a ve shluku I. se nachází zbylých 19 vzorků. Shluk I. se dále rozdělil na podshluk B, kde byla nalezena opět jen jedna odrůda Fire wedge, což byl F1 hybrid a v podshluku A se nachází zbytek odrůd. Podshluk A je možné rozdělit ještě na dvě skupiny, kdy v první skupině jsou dva totožné genotypy 1 a 2, což je vzorek Ps3 (linie) a dále vzorek Nanrub (linie) a odrůdy typu F1 hybridu Jitka. V druhé skupině podshluku A se nachází zbytek kolekce a kromě vzorků 3 a 4 (Ps20) se shodným genotypem a vzorků 17 a 18 (Katlen a Rubína), které jsou klasické odrůdy, neukazuje dendrogram na skutečnost, že by se genotypy seskupovaly dohromady podle toho, jestli jsou linie, hybridy, nebo klasické odrůdy. Protože genetická diverzita rodu *Daucus* je opravdu vysoká, je těžké srovnávat výsledky diverzity tohoto souboru genotypů použitého v mém experimentu a výsledky jiných studií, kde byly použity odlišné genotypy mrkve. Jak už jsem uvedla, výsledky mého experimentu nevedly k separaci například genotypů klasických odrůd od ostatních vzorků. Naproti tomu Briard et al. (2000), analyzovali 9 různých „volně sprášených“ populací a 4 elitní inbrední linie a podle dendrogramu je zjevné, že se inbrední linie úplně oddělily od zbytku genotypů. Baranski et al. (2012) zařadili genotypy mrkve do dvou klastrů podle zeměpisného původu, kde se do jednoho klastru vyčlenila většina genotypů z kontinentální Asie a do druhého klastru pak většina genotypů z Evropy, Japonska a USA.

6 ZÁVĚR

Mrkev obecná je významná rostlina, nejčastěji využívaná jako kořenová zelenina. Díky mnohým šlechtitelským programům a skutečnosti, že se zástupci rodu *Daucus*, včetně planých forem, mohou mezi sebou volně křížit, obsahuje tento rod obrovské množství odrůd, jejichž identifikace a taxonomické zařazení je předmětem současného výzkumu mnohých odborníků.

V této práci jsem se zabývala studiem polymorfismu DNA mrkve. Byla testována izolace DNA u vybraných genotypů mrkve a analýza polymorfismu DNA pomocí PCR a elektroforetických metod. K analýzám bylo použito 20 genotypů mrkve obecné a 10 mikrosatelitních markerů. Díky statistickým ukazatelům DI, PI a PIC bylo zjištěno, že všech deset SSR markerů vykazuje vysokou míru polymorfismu a dva z těchto markerů (107 a 91), byly vyhodnoceny jako velmi vhodné markery pro studium genetické diverzity u mrkve. Bylo detekováno 50 alel a zjištěn průměr 5 alel na lokus. Velikost alel se pohybovala od 180 do 380 párů bazí.

Dále byla zjišťována genetická diverzita pomocí dendrogramu, který ukázal, že z celé kolekce genotypů se separovala samostatně odrůda Maxika v shluku II. a zbytek genotypů byl řazen do shluku I. Ve shluku I. se také oddělila jedna odrůda do samostatného podshluku B, a to odrůda Fire wedge a v podshluku A se nacházelo zbytek odrůd. Těchto zbylých 18 genotypů se nečlenil pravidelně podle toho, jestli byla daná odrůda linie, hybrid, nebo klasická odrůda. Shromážděny byly pouze vzorky 1., 2. a 3., 4., které sestávaly z totožných genotypů a vzorky 17. a 18, což byly klasické odrůdy.

Pro větší variabilitu a lepší výsledky v genetické diverzitě, by bylo potřeba rozšířit kolekci odrůd mrkve a navrhnout více mikrosatelitních markerů.

Všechny praktické analýzy v této práci probíhaly v laboratořích na Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Vědomosti a praktické zkušenosti získané v této práci bych ráda využila při psaní své diplomové práce.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGERBO P., ANDERSEN H. F., 1997: Vitaminy a minerály pro zdravý život. Vyd. 1. Praha: Grada, ISBN 80-7169-489-4

ARBIZU C., RUESS H., SENALIK D., SIMON P. W., SPOONER D. M., 2014: Phylogenomics of the carrot genus (*Daucus*, Apiaceae). *American journal of botany*, vol. 101: 1666-1685

ARUMUGANATHAN K., EARLE E. D., 1991: Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter*, vol. 9: 208-218

BARANSKI R., MAKSYLEWICZ A., NOTHNAGEL T., CAVAGNARO P. F., SIMON P. W., GRZEBELUS D., 2012: Genetic diversity of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars revealed by analysis of SSR loci. *Genetic resources and crop evolution*, vol. 59: 163-170

BRIARD M., LE CLERC V., MAUSSET A. E., VERET A., 2000: A comparative study on the use of ISSR, microsatellites and RAPD markers for varietal identification of carrot genotypes. In: *International symposium on molecular markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in horticulture* 546: 377-385

BUSCHIAZZO E., GEMMELL N. J., 2006: The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 28: 1040 – 1050.

CARLSSON, S. 2003: *Karotka: léčivá síla z kořene*. Hodkovičky: Pragma, ISBN 80-7205-929-7

Carrot museum [online]. 2016 [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: <http://www.carrotmuseum.co.uk/today.html>

CAVAGNARO P. F., CHUNG S. M., MANIN S., YILDIZ M., ALI A., ALESSANDRO M. S., IORIZZO M., SENALIK D. A., SIMON P. W.: Microsatellite isolation and marker development in carrot-genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. [online]. 2011 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/386>

GRZEBELUS D., BARANSKI R., SPALIK, ALLENDER K. C., SIMON P. W., 2011: *Daucus*. Wild crop relatives: Genomic and breeding resources, 91-113, ISBN: 978-3-642-20449-4

HAMBLIN M. T., WARBURTON M. L., BUCKLER E. S., 2007: Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PLoS One*, vol. 2: 1367

HAMPL V., PAVLÍČEK A., FLEGR J., 2001: Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to Trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51: 731 – 735

HANCOCK J. M., 1996: Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, vol. 18: 421–425

JACCARD P., 1908: Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Del La Societé Vaudoise Des Scientes Naturelles*, vol. 44: 223 – 270

JAYARAJ J., DEVLIN R., PUNJA Z., 2008: Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic research*, vol. 17: 489-501

KASHI Y., KING D., SOLLER M., 1997: Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in genetics*, vol. 13: 74–78.

Květena ČR [online]. 2016 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z:
<http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=149>

MAKSYLEWICZ A., BARANSKI R., 2013: Intra-population genetic diversity of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) assessed by analysis of microsatellite markers. *Acta biochimica polonica*, vol. 60: 753–760

MORENO J., PIZARRO C., FUENTES L., HANDFORD P., CIFUENTES M., STANGE V. C., 2013: Levels of Lycopene b-Cyclase 1 Modulate Carotenoid Gene Expression and Accumulation in *Daucus carota*. *PLoS One*, Vol. 8: e58144

NOGALES A., NOBRE T., CARDOSO H. G., MUÑOZ-SANHUEZA L., VALADAS V., CAMPOS M. D., ARNHOLDT-SCHMITT B., 2016: Allelic variation on DcAOX1 gene in carrot (*Daucus carota*L.): Aninteresting simple sequence repeat in a highly variable intron. *Plant gene*, vol. 5: 49–55

PAGE R. D. M., 1996: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, vol. 12: 357 – 358

PATERSON A. H., TANKSLEY S. D., SORRELLS M. E., 1991: DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*, vol. 46: 39-90

PIMENOV M. G., LEONOV M. V., 1993: The genera of *Umbelliferae*: A nomenclator. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. ISBN: 0-947643-58-3

PLUNKETT G. M., SOLTIS D. E., SOLTIS P. S., 1996: Higher level relationships of *Apiales* (*Apiaceae* and *Araliaceae*) based on rbcL sequences. *American journal of botany*, vol. 83: 499–515

Qiagen [online]. 2015 [cit 2016-01-22]. Dostupné z:
<https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>

RONG J., JANSON S., UMEHARA M., ONO M., VRIELING K.: Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota ssp. carota*) populations. *Annals of botany*, mcq108. [online]. 2010 [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: www.aob.oxfordjournals.org

RUSSELL J. R., FULLER J., YOUNG G., THOMAS B., TARAMINO G., MACAULAY M., WAUGH R., POWELL W., 1997: Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*, vol. 40: 442–450

SARWAT M., NABI G., DAS S., SRIVASTAVA P. S., 2011: Molecular markers in medicinal plant biotechnology: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, vol. 32: 74-92, ISSN: 1549-7801

Situační a výhledová zpráva zelenina Prosinec 2015: Praha 2015 Ministerstvo zemědělství, ISBN 978-80-7434-260-8: 35

SOLLER M., BECKMANN J. S., 1983: Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical and applied genetics*, vol. 67: 25-33

SPALIK K., PIWCZYŃSKI M., DANDERSON C. A., KURZYNA-MŁYNIK R., BONE T. S., DOWNIE S. R., 2010: Amphitropic amphiantarctic disjunctions in *Apiaceae* subfamily *Apioideae*. *Journal of biogeography*, vol. 37: 1977 – 1994

Synthesis of Beta-Carotene and Vitamin A [online]. 2016 [cit. 2016-04-07].

Dostupné z:

<http://cbc.arizona.edu/classes/bioc462/462bh2008/462bhonorsprojects/462bhonors2000/mkaplan/syn.html>

TAUTZ D., TRICK M., DOVER G, 1986: Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, vol. 322: 652–656

TÓTH G., GÁSPÁRI Z., JURKA J., 2000: Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome research*, vol. 10: 967-981

VARMA A., PADH H., SHRIVASTAVA N., 2007: Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology journal*, vol. 2: 386–392

ZALAPA J., CUEVAS E., ZHU H., STEFFAN H., SENALIK S., ZELDIN D., McCOWN E., HARBUT B. R., SIMON P., 2012: Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American journal of botany* vol. 99: 193–208

Zemědělské komodity [online]. 2016 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <http://www.zemedelskekomodity.cz/index.php/roslinna-vyroba-menu/okopaniny/mrkev>

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Základní rozdělení odrůd mrkve.....	13
Obrázek 2: Syntetická dráha karotenoidů.....	15
Obrázek 3: Ukázka z kolekce vzorků mrkve.....	20
Obrázek č. 4: Upravený polyakrylamidový gel s SSR markerem 14.....	27
Obrázek č. 5: Dendrogram genetické diverzity.....	31

9 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Srovnání metod využívajících DNA markery.....	17
Tabulka 2: Seznam odrůd použitých v experimentu.....	21
Tabulka 3: Charakteristika markerů použitých v experimentu - první část.....	22
Tabulka 4: Charakteristika markerů použitých v experimentu - druhá část.....	23
Tabulka 5: Seznam složek mastermixu pro PCR.....	24
Tabulka 6: Seznam složek agarózového gelu.....	25
Tabulka 7: Seznam složek polyakrylamidového gelu.....	25
Tabulka 8: Složení elektrolytu pro polyakrylamidovou elektroforézu.....	25
Tabulka 9: Složení roztoku AgNO ₃ pro barvení polyakrylamidového gelu.....	26
Tabulka 10: Složení fixačního roztoku pro barvení polyakrylamidového gelu...	26
Tabulka 11: Složení vývojky pro barvení polyakrylamidového gelu.....	27
Tabulka 12: Výsledná charakteristika SSR markerů.....	30