

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Stanovení polymorfismu DNA u vybraných genů pro
syntézu morfinových alkaloidů u máku setého (*Papaver
somniferum* L.)**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jan Kriner

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění rostlin

Vedoucí práce: Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení polymorfismu DNA u vybraných genů pro syntézu morfinových alkaloidů u máku setého (*Papaver somniferum* L.)" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2018

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. za odborné rady, připomínky a vedení v průběhu celého studia. Dále děkuji Ing. Radce Štikarové a celému kolektivu Katedry genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze za pomoc v laboratoři a cenné rady.

Stanovení polymorfismu DNA u vybraných genů pro syntézu morfinových alkaloidů u máku setého (*Papaver somniferum* L.)

Souhrn:

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je jednoletá rostlina, která se v České Republice pěstuje především jako olejnina. V celé rostlině se vyskytují mléčnice, které obsahují různou směs alkaloidů. Nejznámějším z nich je morfin. V této diplomové práci se zabývám sekvencí jednotlivých genů, které souvisejí s tvorbou sekundárních metabolitů máku setého. Předpokládám, že k identifikaci jednotlivých odrůd máku lze využít sekvenční polymorfismus genů, které jsou součástí biochemické dráhy pro tvorbu morfinových alkaloidů. Pro experimentální část mé práce bylo nutné navrhnout vhodné primery pro amplifikaci genů *CODM*, *COR1* a *T6ODM*, které souvisejí s biosyntézou morfinových alkaloidů. Testováno bylo 31 různých odrůd máku. Pro sekvenaci amplikonů byla zvolena Sangerova metoda. Byly porovnány očekávané a pozorované délky amplikonů. Po úspěšné sekvenaci genů byly následně testovány pro polymorfismus. Frekvence SNP byla nižší, než se předpokládalo. Při amplifikaci *COR1* byl objeven jeho pseudogen, který byl následně úspěšně sekvenován. Existuje předpoklad, že jednotlivé SNP se liší u opiového a potravinářského máku. Získané sekvence genů mohou přispět k dalšímu studiu diverzity máku, jakou jsou např. mikrosatelitní markery.

Klíčová slova: *Papaver somniferum* L., SNP, morfinové alkaloidy, polymorfismus genů, pseudogeny

Assessment of DNA polymorphism in selected genes for synthesis of morphine alkaloids in poppy (*Papaver somniferum* L.)

Summary:

Poppy flower (*Papaver somniferum* L.) is an annual herb cultivated primarily in the Czech Republic as an oil plant. The whole plant contains dairy milks that contain a different mixture of alkaloids. The most famous of these is morphine. In this diploma thesis I deal with the sequence of individual genes that are related to the formation of secondary metabolites of poppy seed. I assume that sequential polymorphism of the genes that are part of the biochemical pathway for the formation of morphine alkaloids can be used to identify the individual poppy flowers. For the experimental part of my work it was necessary to design suitable primers for the amplification of *CODM*, *COR1* and *T6ODM* genes which are related to morphine alkaloid biosynthesis. 31 different varieties of poppy have been tested. For the sequencing of amplicons, the Sanger method was chosen. The expected and observed amplicon lengths were compared. After successful gene sequencing, they were subsequently tested for polymorphism. The frequency of SNP was lower than predicted. In the amplification of *COR1* his pseudogen was discovered, which was subsequently successfully sequenced. There is a presumption that individual SNPs are different for opium and food poppy. The gene sequences obtained can contribute to further study of poppy diversity, such as microsatellite markers.

Keywords: *Papaver somniferum* L., SNP, morphine alkaloids, polymorphism od genes, pseudogenes

Seznam zkratek:

- AFLP** - amplified fragment length polymorphism (délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů)
- bp** - base pair (pár bází)
- cDNA** - complementary DNA (DNA syntetizovaná podle RNA)
- CDS** – coding sequence (kódující sekvence)
- CODM** - Codeine O-demethylase (kodein O-demetyláza)
- COR1** - NADPH-dependent codeinone reductase 1 (NADPH dependentní kodein reduktáza)
- DNA** - deoxyribonucleic acid (dioxiribonukleová kyselina)
- EDTA** - ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
- EST** - expressed sequence tag (sekvence odvozená z cDNA)
- GMO** - genetically modified organism (geneticky modifikovaný organismus)
- NCBI** - National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)
- NGS** - new generation sequencing (nová generace sekvenování)
- NSC** - (S)-Norcoclaurine synthase (norkoklaurin syntáza)
- PCR** - Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
- TBE** - tris-borate-EDTA buffer (tris-borátový pufr)
- SNP** - single-nucleotide polymorphism (Jednonukleotidový polymorfismus)
- T6ODM** - Thebaine 6-O-demethylase (thebain 6'-O-demetyláza)
- TYDC** - tyrosine/dihydroxyphenylalanine decarboxylase (tyrosin dekarboxyláza)
- ÚKZÚZ** - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
2.1	Vědecká hypotéza	2
2.2	Cíle práce	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Papaver somniferum L.	3
3.1.1	Botanika máku	3
3.1.2	Sekundární metabolity máku setého	4
3.1.2.1	Morfin	4
3.1.2.2	Kodein.....	5
3.1.2.3	Thebain.....	5
3.2	Biosyntéza morfinových alkaloidů.....	5
3.2.1	Kaskáda vedoucí k morfinovým alkaloidům	5
3.2.1.1	(S)-norkoklaurin.....	5
3.2.1.2	(S)-retikulin	6
3.2.1.3	Salutaridin	6
3.2.1.4	Thebain, kodein a morfin	6
3.3	Pseudogeny.....	8
3.4	Kapilární elektroforéza	9
3.4.1	Obecné principy a pojmy	9
3.4.2	Příprava vzorku.....	10
3.4.3	Odběr vzorku	10
3.4.4	Separace	10
3.4.5	Vnitřní povrch kapiláry.....	11
3.4.6	Detekce DNA.....	12
3.5	Sekvenování DNA.....	12
3.5.1	První generace sekvenování.....	12
3.5.2	Druhá generace sekvenování	14
3.5.3	Třetí generace sekvenování	16
3.6	Chybovost dat.....	17
4	Materiál a metody	19
4.1	Rostlinný materiál.....	19
4.1.1	Izolace DNA	20
4.1.2	Kvalita a kvantita izolované DNA	21
4.2	Bioinformatická analýza.....	21
4.2.1	Design primerů	21

4.3	PCR.....	25
4.4	Agarózová elektroforéza.....	25
4.5	Sekvenování DNA.....	25
4.5.1	Purifikace DNA z gelu.....	25
4.5.2	Sekvenační reakce.....	26
4.5.3	Purifikace po sekvenční reakci	27
4.5.4	Sekvenace	28
4.5.5	Analýza sekvenčních dat	28
5	Výsledky.....	29
5.1	Výsledky testování primerů	29
5.1.1	Výsledky amplifikace primerů pro gen <i>CODM</i>	30
5.1.2	Výsledky amplifikace primerů pro gen <i>COR1</i>	31
5.1.3	32	
5.1.4	Výsledky amplifikace primerů pro gen <i>T6ODM</i>	32
5.2	Výsledky sekvenování a polymorfismu	33
5.2.1	Výsledky sekvenace <i>CODM</i>	33
5.2.2	Výsledky sekvenace <i>COR1</i>	36
5.2.3	Výsledky sekvenace <i>T6ODM</i>	41
6	Diskuze.....	43
7	Závěr	46
8	Bibliografie	47
8.1	Literární zdroje	47
8.2	Internetové zdroje	54
8.3	Seznam tabulek.....	54
8.4	Seznam obrázků	54
9	Přílohy.....	55

1 Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je jednoletá rostlina, která se v České Republice pěstuje především jako olejnina. V celé rostlině se vyskytují mléčnice, které obsahují různou směs alkaloidů. Nejznámějším z nich je morfin, který se využívá jak ve farmacii, ale i ilegálně zneužívá pro tvorbu opiových drog. Jeho syntéza je řízena kaskádou enzymatických reakcí s různou genovou expresí jednotlivých genů.

Různé odrůdy máku mají různé zastoupení alkaloidů a ve světě se pěstuje zcela jiný mák než v naší republice. Často dochází k příměsím nekvalitních semen do distribuce pro potravinářské účely. V této diplomové práci se zabývám sekvencí jednotlivých genů, které souvisejí s tvorbou sekundárních metabolitů máku setého. Analýza polymorfismu jednotlivých genů, které jsou součástí biochemické dráhy pro tvorbu morfinových alkaloidů, může přispět ke vzniku metody pro identifikaci jednotlivých odrůd máku.

Jelikož jsou v genových databázích pouze EST sekvence, je nutné optimalizovat amplifikaci jednotlivých genů a následně zvolit metodu sekvenování. K dnešnímu dni neexistuje podobná studie zabývající se polymorfismem daných genů, a proto získané sekvence mohou přispět k dalšímu studiu diverzity máku, jakou jsou např. mikrosatelitní markery.

2 Cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

K identifikaci jednotlivých odrůd máku lze využít sekvenční polymorfismus genů, které jsou součástí biochemické dráhy pro tvorbu morfinových alkaloidů.

2.2 Cíle práce

Z uvedené hypotézy vyplývají následující cíle práce:

- Uskutečnit bioinformatickou analýzu sekvenčních dat pomocí genových databází typu GenBank, NCBI
- Navrhnout vhodné primery pro vybrané geny (*COR1*, *T6ODM*, *CODM* popř. jiné)
- Optimalizovat podmínky PCR pro účely sekvenování
- Testovat jednotlivé genotypy pro polymorfismus
- Porovnat očekávané a předpokládané velikosti ampliconů, jelikož jsou známy pouze EST sekvence

3 Literární rešerše

3.1 *Papaver somniferum* L.

3.1.1 Botanika máku

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je dvouděložná rostlina patřící do řádu pryskyřníkotvaré (*Ranunculales*), do čeledi makovité (*Papaveraceae*) (Dostál, 1950).

Mák se dle nálezů pěstoval na území dnešní Sýrie minimálně od 6. tisíciletí př. n. l. a farmakologicky pro výrobu opia byl využíván o tisíc let později na témže místě (Kubánek, 2009). Mák se zemědělsky rozděluje na mák opiový a mák semenný či olejný. Opiový má farmakologické využití pro vyšší obsah alkaloidů. Olejný mák má využití v potravinářství. Česká republika patří k světovým velmocím pěstování máku. Na našem území má jeho pěstování dlouholetou tradici. Roční světová spotřeba máku se pohybuje mezi 70-80 tisíci tun semen. V roce 2008 se v České republice vypěstovalo na 70 000 ha půdy přes 50 000 tun semen máku setého. V posledních letech se produkce kvůli nízkým výkupním cenám snížila o polovinu (Kubánek, 2009; Vašák, 2016) Jelikož se z máku získává řada opioidních alkaloidů, je jeho pěstování u nás regulováno zákonem č. 167/1998 Sb. - o návykových látkách ve znění pozdějších předpisů, ze kterého plyne povinnost ohlášení pěstování máku na ploše větší než 1 ha.

V máku se nachází trubicovité mléčnice, které prostupují celou rostlinou. Mléčnice vznikly řízenou apoptózou buněk. Uvnitř mléčnic je obsažena koloidní směs sekundárních metabolitů, latex. Nejvíce mléčnic je v plodu máku, tobolece. V semenech se nenacházejí mléčnice, a tudíž zde nejsou zastoupeny ve větší míře ani alkaloidy. Pokud se provádí analýza semen a zjistí se přítomnost stopového množství alkaloidů, jedná se nejpravděpodobněji o zbytky z drti tobolek, které ulpěly na daném semeni (Bechyně et al., 2001).

V České republice se v posledních letech dle ČSÚ nejvíce pěstují odrůdy Major, Opal, Maratón, Aplaus, Onyx a Bergam. Ty dohromady tvoří přes 90 % celkové masy vypěstovaného máku u nás. Jedná se o české odrůdy využívané v potravinářství. Obsah morfinu se průměrně pohybuje mezi 40 mg na kilogram živé váhy rostliny (Vašák, 2016).

3.1.2 Sekundární metabolity máku setého

Většina sekundárních metabolitů u máku setého patří do skupiny alkaloidů. Obsah látek v rostlině velice kolísá a pohybuje se v rozmezí 0-0,35 % alkaloidů na makovici bez semen. Jednotlivé typy a množství sekundárních metabolitů ovlivňuje prostředí, způsob pěstování, genotyp rostliny i denní cyklus. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině kromě semen, jejich nejvyšší koncentrace je v mléčnicích makovice (Vašák, 2016).

Sekundární metabolity máku setého se v historii používaly spíše pro své letální účinky, kdy minimální letální dávka u člověka pro morfin byla stanovena na 200 mg. Až později se využívaly v lékařství pro výrobu léčiv a jako opioidy, které jsou schopny vázat se na dané receptory v nervové soustavě a tím působit tlumivé účinky (Yekkirala et al., 2009). V máku můžeme nalézt minimálně přes 50 alkaloidů, řada z nich má opiové účinky (Bechyně et al., 2001).

Nejen makové alkaloidy se vyznačují vysokou bazicitou, která je dána navázáním atomu dusíku v heterocyklu celé molekuly. Pro jejich biosyntézu jsou nezbytné biogenní aminokyseliny fenylalanin, tryptofan, histidin a lysin. V rostlině nalezneme většinou jeden hlavní alkaloid a větší počet vedlejších alkaloidů, které biosynteticky předchází danému hlavnímu alkaloidu (Chaturvedi et al., 2014). O významu sekundárních metabolitů obecně existují četné studie. Přisuzuje se jim role v ochraně proti patogenům a škůdcům či odbourávání toxických dusíkatých látek v těle rostliny. Rostliny pro biosyntézu alkaloidů spotřebují veliké množství zásobní energie a zapojení velkého počtu specifických enzymů (Ziegler et Facchini, 2008). Zpětný metabolismus pro degradaci alkaloidů však rostliny nemají, pro syntézu velkého množství sekundárních metabolitů musejí mít tedy neopomenutelný účel, kterému musíme teprve porozumět (Kubánek, 2009).

3.1.2.1 Morfin

Mezi morfinové alkaloidy se řadí alkaloidy fenantrenové. Nejčastějším typem vyskytujícím se v opiu je morfin. Tento alkaloid byl izolován na začátku 19. století a jeho chemická struktura popsána na začátku 20. století. Jeho analgetické účinky jsou využívány v lékařství. Jeho účinek spočívá v navázání na receptory především v mezimozku, kde blokuje monoaminy. Přerušuje systém vedení vzruchu v míše, kde blokuje synaptické spojení nervových buněk (Yekkirala et al., 2009). Morfin se využívá i při tvorbě dalších léčiv jako je ethylmorfin, hydromorfon či diacetylmorfin, známý spíše jako heroin.

3.1.2.2 Kodein

Mezi další morfinové alkaloidy se řadí kodein, N-methylmorfin. Až do 70. let minulého století byl výhradně využíván pouze jako léčivo. Do té doby se používal přírodní kodein, který byl celkem vzácný a nebyl běžně dostupný. Po výrobě syntetického kodeinu z derivátu ropy, se stal kodein opiátovou náhražkou pro lidi z vyšší sociální skupiny (Bigelow et Edgar, 2006). Jedná se o nejrozšířenější opiát ve světě a je součástí běžně užívaných analgetických léků. Spolu s paracetamolem či kyselinou acetylsalicylovou působí synergicky a poskytuje úlevu od bolesti.

3.1.2.3 Thebain

Thebain neboli methylether kodeinu má strukturu podobnou jak morfinu, tak kodeinu. Působí antidepresivně a při vyšších dávkách má účinky podobné jedu strychninu. U máku setého se vyskytuje především v mladé rostlině. Pokud metabolismus rostliny pracuje správně, většina thebainu je přeměněna na isothebain, následně na morfin (Mikus et al., 2008). Jako hlavní alkaloid se vyskytuje u máku listenatého (*Papaver bracteatum* Lindl).

Všechny morfinové alkaloidy se vyznačují účinkem na centrální nervovou soustavu. Alkaloidy papaverinového typu jako jsou papaverin, narkotin či narcein mají účinek na hladké svalstvo a působí spasmolyticky (Lüllmann et al., 2004).

3.2 Biosyntéza morfinových alkaloidů

3.2.1 Kaskáda vedoucí k morfinovým alkaloidům

3.2.1.1 (S)-norkoklaurin

Jak již bylo uvedeno, alkaloidy jsou jedním z nejčastějších typů sekundárních metabolitů u rostlin se zabudovaným atomem dusíku v heterocyklu. Morfin, kodein a thebain patří do skupiny benzylochinolinových alkaloidů. Je popsáno více než 2500 chemických sloučenin. Nejvíce mají zastoupení v čeledích *Papaveraceae* a *Ranunculaceae*. Biosyntéza těchto metabolitů převážně začíná dekarboxylací tyrosinu na tyramin nebo přeměnou dihydroxyfenylalaninu na dopamin pomocí tyrosin dekarboxylázy (TYDC) (Ziegler et Facchini, 2008). TYDC patří do velké rodiny enzymů, 15 jich je známo u máku setého (Gurkok et al., 2016). Dopamin je prekurzorem pro isochinolinovou část, tyramin pro benzylovou část. Spojení těchto dvou částí dohromady za vzniku (S)-norkoklaurinu katalyzuje

enzym norkoklaurin syntáza (NSC). Tento enzym byl prvně izolován v rostlině žlutého žlutá (*Thalictrum flavum* L.). Tento enzym se projevuje při patologické reakci rostliny.

V nedávné době byl objeven podobný enzym, který je schopen vytvořit kostru enantiomeru molekuly (S)-norkoklaurinu. Z kamélie japonské (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don) byl izolován enzym 2-oxoglutarát dependentní dioxygenáza, který je schopný katalýzy proteinů na daný enantiomer norkoklaurinu (Yamada et al., 2016). Je pozoruhodné, že dva různé enzymy z nepříbuzných rodů rostlin mohou katalyzovat stejné reakce.

3.2.1.2 (S)-retikulin

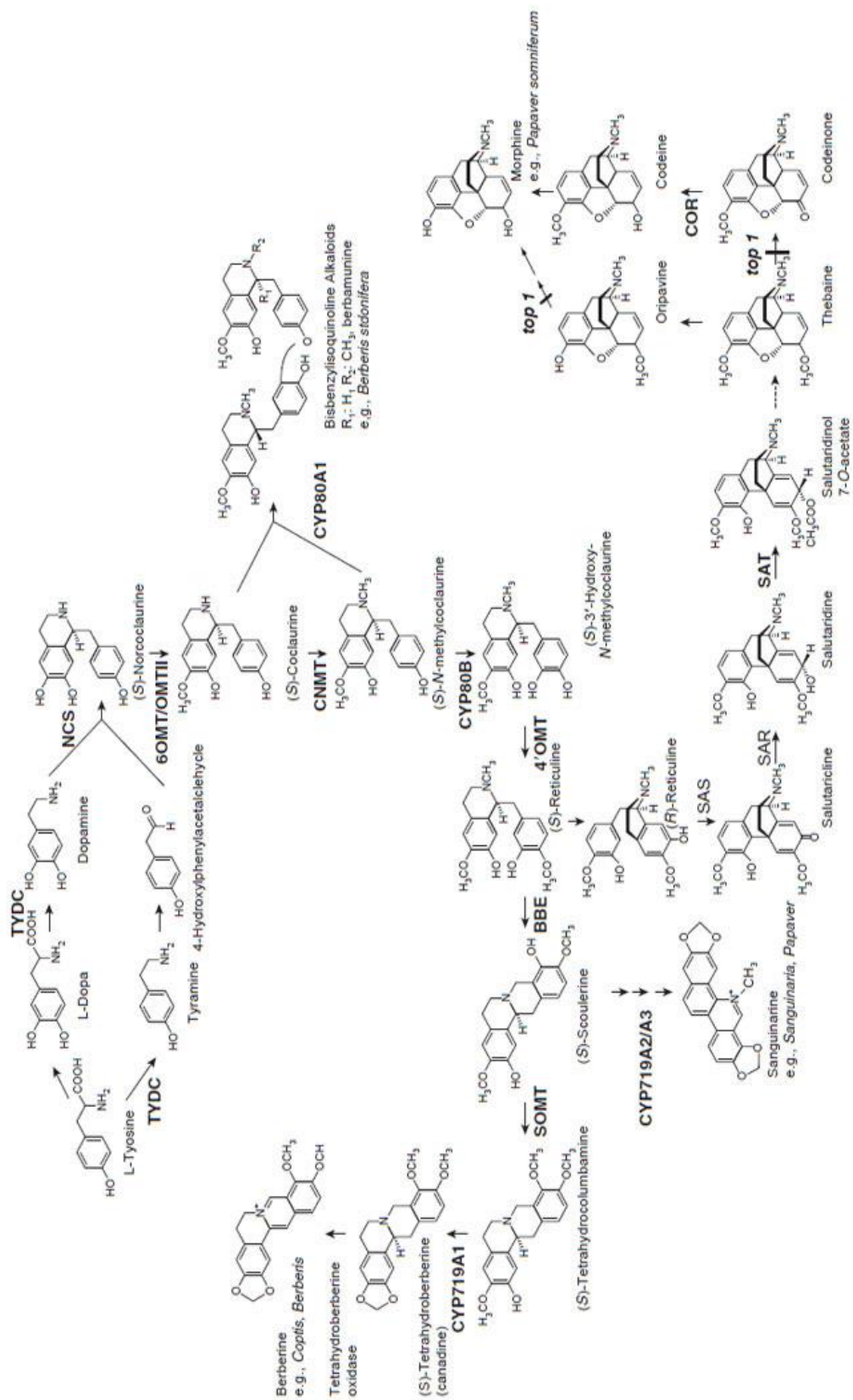
Přeměna (S)-norkoklaurinu na (S)-retikulin zahrnuje kaskádu 2 metylací a hydroxylace. Nejprve dojde k O-methylaci na pozici 6, následně k hydroxylaci na uhlíku 3 a nakonec k O-methylaci na uhlíku 4. Metyltransferázy mají značení XOMT, kde písmeno X značí pozici uhlíku, kde probíhá metylace. Tyto enzymy vykazují přísnou specifickou na místo dané metylace (Ziegler et al., 2005). S enantiomer retikulinu je centrální meziprodukt, ze kterého je odvozena většina benzylochinolinových alkaloidů. Pouze dimerické alkaloidy nejsou odvozeny od této sloučeniny.

3.2.1.3 Salutaridin

Hlavní větev, která vede k morfinovým alkaloidům, není přes (S)-retikulin, ale přes jeho R enantiomer. Přeměna sestává ze dvou kroků, kdy je S enantiomer oxidován 1,2-dehydroretikulin syntetázou a následně zpětně redukován na R formu (Hirata, 2004). Intramolekulová fenolická vazba mezi uhlíky C2 benzylové části a C4 isochinolinové části vede ke vzniku salutaridinu za účinku salutaridin syntázy. Dalším krokem je katalýza salutaridin reduktázou na salutaridinol. Enzymem 7-O-acetyltransferázou je katalyzován na salutaridinol-7-O-acetát (Grothe et al., 2001).

3.2.1.4 Thebain, kodein a morfin

Acetylová skupina je spontánně oddělena od molekuly salutaridinolu a následnou vazbou mezi uhlíky C4 a C5 vzniká thebain. Jedná se o první pentacyklický alkaloid této komplikované kaskády (Ziegler et Facchini, 2008). Dvě demethylace a jedna redukce je následně potřeba k získání konečného alkaloidu morfinu. Methylace thebainu na kodeinon a následně na kodein není k dnešnímu dni uspokojivě enzymaticky vysvětlena. Roli zde určitě hraje enzym kodein reduktáza, který byl izolován z máku setého (Unterlinner et al., 1999).



http://www.eplantscience.com/index/plant_pathways/images/f.1.1.02_large.jpg

Obrázek 1 Biosyntéza morfinových alkaloidů

3.3 Pseudogeny

Pseudogeny jsou úseky DNA, které postrádají vlastní expresi. Pseudogeny ztratily evolučně svoji funkci genetické exprese, kterou zajišťuje hlavní kódující gen (Vanin, 1985). Nejspíše se jedná o vícenásobné mutace v genu, jehož produkt není svázán s primárním metabolismem daného organismu. Těmito mutacemi docházelo k vyřazení funkčního genu a zároveň ke kulminaci nekódující DNA ve vlastním genomu. Přestože nekódují žádný funkční protein, zastávají v genomu regulační funkci (Chan et Chang, 2014).

Dříve byly považovány za tzv. „odpadní DNA“ (junk DNA), která nemá žádnou funkci. Jelikož je pseudogen podobný určitému funkčnímu genu, jeho studiem můžeme zjistit historii a evoluční divergenci daného genu (Zheng et al., 2007). Některé pseudogeny nemají introny či promotory, jiné je v čase neztratily. Jejich nefunkčnost vlastní exprese spočívá v předčasné inkorporaci stop kodonů vedoucí k předčasné terminaci transkripce. Termín pseudogen se poprvé začal užívat v roce 1977 (Jacq et al., 1977).

Homologie je podmíněna sekvenční podobností pseudogenu a kódujícího genu. Po zarovnání sekvencí obou komplement lze procentuálně vyjádřit vzájemnou podobnost. Pokud je podobnost vysoká, znamená to, že tyto dvě homologní sekvence nejspíše nemohly vzniknout nezávisle na sobě. Pseudogeny mohou komplikovat molekulárně genetické studie. Při polymerázové řetězové reakci (PCR) se zároveň může amplifikovat pseudogen, který sdílí podobné sekvence jako hledaný strukturální amplikon. Tento jev se označuje jako zkreslené zesílení PCR. Nastává tedy chyba v nesprávné identifikaci genů či jejich exonů. Naopak identifikace retrotransponovaných pseudogenů může být využita pro zvýšení přesnosti predikování genů (Van Baren, 2006).

Pseudogeny se rozdělují do čtyř typů. Retrotransponované pseudogeny jsou odvozeny od mRNA zbavené intronů. Reverzní transkriptázou jsou zpětně kódovány do DNA. Jejich nefunkčnost tkví v absenci promotoru. Vyskytují se především u savců. U člověka se lidský genom skládá až ze 44 % z opakujících se sekvencí (Baertsch et al., 2008).

Netransponované (duplicitní) pseudogeny vznikaly jako funkční kopie daného genu. V čase svoji funkci ztratily v důsledku mutace. Na fitness jedince to nemělo větší efekt, jelikož měl v záloze funkční kopii kódujícího genu. Studiem duplicitních pseudogenů se prokazují evoluční modely příbuznosti např. u primátů (Lynch, 2013).

Unikátní pseudogen je nejčastěji deaktivovaný funkční gen, který nebyl v čase duplikován. Jeho fixace je zapříčiněna genetickým driftem a přirozeným výběrem. Pseudopseudogeny jsou pseudogeny se stop kodony, které jsou z neznámého důvodu translatovány. V genomu je pak fixován přirozenou selekcí. Ze 4 % je stop kodon vyhodnocen jako triplet pro aminokyselinu a nikoliv jako povel pro ukončení translace. Tento jev byl popsán u rodu *Drosophila*. (Prieto-Godino et al., 2016).

3.4 Kapilární elektroforéza

3.4.1 Obecné principy a pojmy

Kapilární elektroforéza je jednou ze separačních metod, která využívá rozdílnou prostupnost látek v elektrickém poli. Separace látek probíhá v tenké kapiláře se silikagelem. Tato metoda je v porovnání s ostatními metodami vysoce senzitivní a umožňuje částečnou automatizaci (Camilleri, 1998). V literatuře se objevuje pod zkratkou HPCE, což z anglického překladu znamená vysokoúčinná kapilární elektroforéza. Účinností a citlivostí dosahuje až na úroveň zeptomolů (10^{-21}). Pod pojmem kapilární elektroforéza dnes rozumíme nejen kapilární gelovou elektroforézu, ale i ostatní elektroforézy využívající kapiláry jako jsou např. isotachoforéza, micelární elektrokinetická chromatografie či zónová elektroforéza. Tato metoda byla hlavní metodou HUGO, tedy přesného stanovení lidského genomu. (Camilleri, 1998).

Základní veličinou elektroseparačních metod je mobilita, která je definována jako pohyb nabitých částic v kapalném prostředí v elektrickém poli se stejným směrem napětím. $m = v/E$ ($m^2V^{-1}s^{-1}$) kde v je rychlost pohybu v el. poli, které má intenzitu E (Kašička, 1997).

Kapilární gelová elektroforéza se nejen v genetice využívá k separaci biomakromolekul v závislosti na jejich velikosti. Dutá kapilára z tavného křemene s průměrem okolo 50 μm obsahuje uvnitř polymerní médium tvořící molekulové síto, přes které molekuly prostupují. Jednotlivé fragmenty se pohybují ke katodě různou rychlostí na základě své mobility (Kašička, 1997). V genetických analýzách se nejčastěji využívá UV/Vis nebo fluorescenční detektor. Detekuje až 6 různých signálů barev jako je např. FAM, VIC, NED, PET a LIZ (2005).

3.4.2 Příprava vzorku

Příprava vzorků je velmi důležitou součástí každého sekvenčního protokolu nejen u studia DNA. Dostatečná amplifikace dané DNA zbavená od nečistot je nezbytná pro efektivní čtení DNA sekvence. Kvalita amplifikovaných sekvencí může být zlepšena přítomností betainu, který snižuje tvorbu sekundárních struktur způsobené opakujícími se CG oblastmi amplikonu (Mamedov et al., 2008).

Pokud jsou ve vzorku nečistoty, mohou zapříčinit nejen chybnost čtení sekvence, ale i poškodit kapiláru. Ve vzorku by neměly být rozpuštěné soli, které jsou kapilárou nasávány přednostně, díky své vysoké elektronegativitě. Soli jsou ze vzorku většinou odstraněny ethanolem (Ruiz-Martinez et al., 1998).

3.4.3 Odběr vzorku

Vzhledem k vysoké viskozitě většiny matric jsou vzorky DNA obvykle do kapiláry naváděny elektromigrací. Přesné stanovení elektrického pole se liší pracoviště od pracoviště. Některá využívají menšího napětí, které zamezuje přehřívání, což snižuje roztažnost polymeru v kapiláře. Tím nedochází ke ztrátám DNA. Pokud se však využije velký skok v napětí (ramp), výrazně se zkracuje doba trvání analýzy. Pro správný odběr by mělo být zachováno neutrální pH. Pro správné vedení vzorku v kapiláře je naopak vhodné zásaditější pH. Postříbřené kapiláry našly využití pro přímě injekce vzorku bez přítomnosti elektrolytů (Karger et Guttman, 2009).

3.4.4 Separace

Dříve se využívaly kapiláry s pevně nanesenou vrstvou gelu. Pro svou malou životnost byly nahrazeny kapilárami s vyměnitelnou maticí. Využití lineárního polyakrylamidu vzbuzovalo podezření, že nebude možné správně číst delší řetězce nad 2000 bp DNA. Navíc častá výměna matrice způsobuje významné snížení efektivity separace. Byla pozorována rozdílná měření při umístění kapiláry ve vodorovné či svislé poloze. V praxi však rozdílná měření nebyla potvrzena (Ruiz-Martinez et al., 1998). Až na výjimky se dnes využívají kapiláry s vyměnitelnou maticí. Dříve se využívali matrice na bázi lineárního polyakrylamidu, polyethylenoxidu, hydroxyethylcelulózy, polydimethylakrylamidu, polyvinylpyrrolidonu či polyakryloylaminopropanolu. Bylo zjištěno, že větší molekulová hmotnost polymeru má za následek možnost čtení delších fragmentů DNA s přímo se

zhoršující kvalitou čtení kratších úseků DNA. Dnes se nejčastěji jako molekulární síto využívá polyakrylamidový gel (Camilleri, 1998).

Délka čtení sekvence závisí na mnoha faktorech, jako je teplota, el. napětí či molekulová hmotnost polymeru. Výsledky prokázaly, že polyakrylamid s vhodnou kapilárou je schopen přečíst 1000 bp DNA s 97% přesností za 80 minut (Carrilho et al., 2006). Tato hodnota je však pod rutinní uznávanou hodnotou sekvenování DNA, která činí 98,5 %. Polymerací polyakrylamidu bylo dosaženo účinnosti 99,22 % pro prvních 800 bp DNA a 98,16 % pro prvních 900 bp DNA (Carrilho et al., 2006). Je možné separovat fragmenty delší než 1000 bází, ale doba separace převyšuje 8 hodin (Kim et Yeung, 1997). Tato doba se dnes radikálně snížila a pohybuje se kolem jedné hodiny na 1000 bází sekvence (Karger et Guttman, 2009).

Bylo vynaloženo úsilí vyměnit tyto matrice za jiné separační média. Byla testována nanočlávková pole, která slouží jako mikro překážky procházející DNA a v budoucnu by mohla nahradit gelovou kapilární elektroforézu. Dokonce byly vyzkoušeny metody bez využití elektrolytů s uspokojivými výsledky (Albrecht et al., 2011). Tato metoda využívá směs proteinů, které vytvářejí třecí sílu.

V souladu s teorií migrace polyelektrolytů, jako je např. DNA, se ve vysokém elektrickém poli snižuje čas migrace těchto molekul. Na druhou stranu se snižuje velikost separované DNA, kdy se velké fragmenty pohybují stejnou mobilitou a neseperují se. Jak již bylo zmíněno, nikde není uvedena přesně stanovená konfigurace elektrického pole a záleží na empirickém výzkumu pracoviště, které hodnoty dosadí do analýzy (Camilleri, 1998). Byly prováděny pokusy na změnu teploty, frekvence či modulace el. pole, ale nebyla prokázána zlepšení v porovnání s využitím stejnosměrného proudu.

3.4.5 Vnitřní povrch kapiláry

Bylo prokázáno, že některé polymery mohou působit jako molekulární síta, a tudíž provádět separaci v holých kapilárách s tavným křemenem. Životnost těchto holých kapilár je bohužel menší, protože se jejich výkon snižuje v průběhu opakování elektroforézy. Nejvíce v pokusech vydržely kapiláry s polydimethylakrylamidem. Hjertenova metoda nástřiku stěn kapiláry křemenem má menší životnost než postup dle Grignarda (Hjertén, 1985; Huang et al., 1998). Polyvinylalkohol je další látka, která se používá při nátěru kapilár. Tato látka má

při reakci s borátovým pufrům velmi negativní náboj. Pro elektroforézu je tedy nutné využít neborátový pufr, který bude mít afinitu k záporně nabitě DNA (Quigley et Dovichi, 2004).

Nynější životnost kapilár se komerčně udává kolem 500 cyklů. Pokusy však dokazují, že kapilára se správným zacházením dokáže poskytnout kvalitní výsledky i po dvojnásobném počtu cyklů.

3.4.6 Detekce DNA

Pro detekci fragmentů DNA při kapilární elektroforéze se nejčastěji využívá laserová indukční fluorescence. V minulosti se využívalo čtyř základních barev (FAM, JOE, ROX a TAMRA) (Camilleri, 1998). Dnes jsou detektory schopny rozeznat systém až 6 barev o různé vlnové délce. Nejčastěji se využívá argonový laser s excitovanou fluorescencí při 488 nm nebo helium-neonový laser s excitovanou fluorescencí v hodnotě 543 nm. Účinnost detekce se pohybuje mezi 97 %. Dnes existuje mnoho modelů využívající různé barvy pro konkrétní biomakromolekuly (Ruiz-Martinez et al., 1998).

3.5 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA je molekulární postup stanovení přesného pořadí nukleotidů, tedy primární struktury DNA. Zahrnuje jakoukoli metodu nebo technologii, která se využívá k určení pořadí dusíkatých bází v řetězci nukleové kyseliny. Nejzákladnější metody vznikaly na začátku 70. let minulého století. V dnešní době se díky novým metodám a postupům výrazně urychlil biologický a lékařský výzkum. Díky rychlosti čtení a komerční dostupnosti sekvenování je možné sekvenovat celé genomy různých druhů organismů včetně člověka (Pettersson et al., 2009).

3.5.1 První generace sekvenování

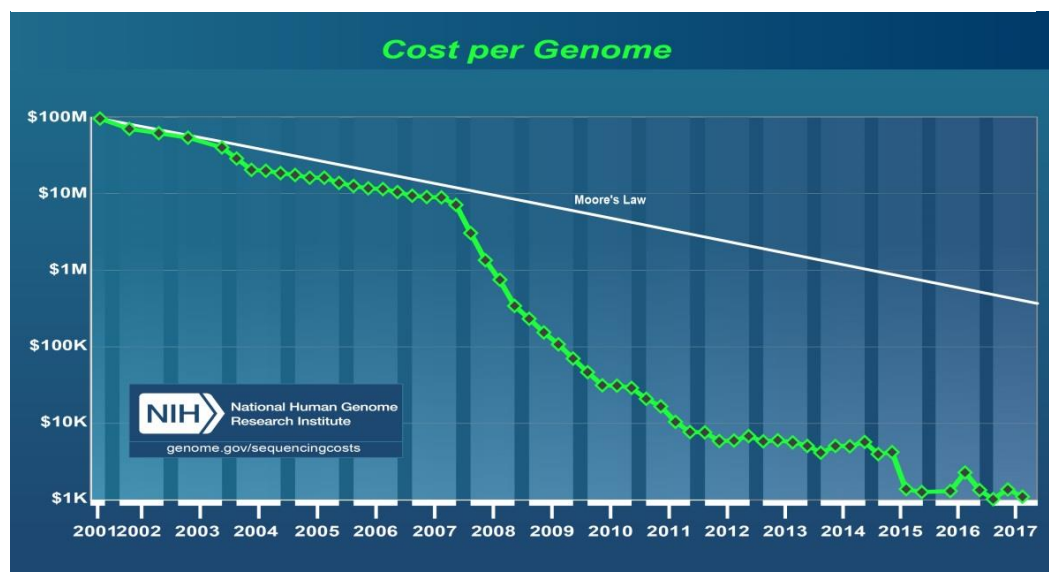
Po objevení struktury DNA v roce 1953 mohl průkopník v sekvenování Frederick Sanger přestoupit od sekvenování proteinů k sekvenování DNA. Již v roce 1955 dokončil sekvenci všech aminokyselin v inzulinu. Tento objev poskytl důkaz, že proteiny jsou spíše než náhodná směs materiálu suspendovaného v tekutině specifické sekvence aminokyselin. Vzájemnými publikacemi s doktorem Watsonem a Crickem byla vytvořena teorie o uspořádání nukleotidů v DNA, která určuje sekvenci aminokyselin v proteinech (Watson et Crick, 1953; Sanger et al., 1977).

První pokus o určení sekvence DNA (1973) využíval chemickou syntézu specifických primerů pro danou DNA bakteriofága T4. Následně byla stanovena sekvence kohezivních konců DNA u bakteriofága lambda (Padmanabhan et al., 1974). Posléze bylo zjištěno, že tato metoda se může použít k určení jakékoliv sekvence DNA za použití lokálně specifických primerů. Tuto metodu přijal Sanger a rychlostně ji vylepšil (Sanger et al., 1977).

Jeho metoda spočívala ve využití replikace DNA. Jednovláknový řetězec DNA se postupně vkládá do reakční směsi s radioaktivně značeným primerem, *Taq* polymerázou, volnými deoxyribonukleotidy a radioaktivně (později fluorescenčně) značenými dideoxyribonukleotidy. Pokud se při syntéze začlení dideoxyribonukleotid, nemůže dále probíhat elongace. Různé báze dideoxyribonukleotidů mají vlastní nádobu se vzorkem. Sekvence tedy zákonitě končí jedním ze značených dideoxyribonukleotidů. Výsledkem je tedy směs fragmentů DNA, které se liší o jednu bázi. Elektroforézou jsme pak schopny rozeznat jednotlivé nukleové báze (Sanger et al., 1977).

Sangerovu metodu sekvenace za využití dideoxyribonukleotidů pro ukončení přepisu řetězce DNA převzaly přední vědecká pracoviště pro svoji rychlost, nenáročnost a spolehlivost. Tento princip sekvenování byl primárně využíván až do začátku 21. století. Do tohoto období bylo dosaženo velikého pokroku v této technice jako je fluorescenční značení dideoxyribonukleotidů, kapilární elektroforéze či automatizaci. Čím více pracovišť provádělo sekvenaci, tím více klesaly celkové náklady na sekvenování. V době vzniku metody by sekvenace celého lidského genomu přišla na více než 3 miliardy dolarů, po roce 2010 je to již méně jak tisíc dolarů (Metzker, 2010; 2017).

Obrázek 2 Vývoj ceny sekvenování lidského genomu



https://www.genome.gov/images/content/costpergenome_2017.jpg

Ve stejném roce, kdy publikoval svou metodu sekvenování Sanger, pan Maxam s panem Gilbertem vytvořili vlastní metodu sekvenování DNA. Je postavena na základě chemické modifikace DNA a následného štěpení na specifických místech. Pro tuto metodu je vlastní, že nepotřebuje zmnožení templátové DNA. Sekvenování Maxam-Gilbert vyžaduje radioaktivní značení na jednom z 5' konci DNA a naprostou čistotu templátové DNA. Chemické ošetření vytváří v DNA zlomy v jedné až dvou ze čtyř bází v každé ze čtyř reakcí (G, A/G, C, C/T). Takto se vytvoří řada označených fragmentů DNA, které jsou následně podrobeny elektroforéze na akrylamidových gelech. Pro vizualizaci fragmentů je gel vystaven rentgenovému záření. Ze získaného radiogramu lze odvodit sekvenci DNA. Pro svoji potřebu radioaktivně značit DNA a svoji technickou složitost nebyla metoda rozsáhle používána (Maxam et Gilbert, 1977).

3.5.2 Druhá generace sekvenování

Sekvenování první generace, využívající Sangerovu metodu dideoxiribonukleotidů, měla menší nedostatek, kterou byla především rychlost. Před samotnou sekvenací je nutné namnožit zkoumanou DNA a tento krok může trvat v řádu hodin až dní dle typu výchozího materiálu. V druhé generaci sekvenování již sekvenátory umožňují detekci až tisíce molekul DNA za kratší dobu. Projekt HUGO trval se Sangerovou metodou 10 let. S použitím druhé generace by byl lidský genom kompletně osekvenován v řádu jednoho až dvou měsíců za nižších nákladů (Hall, 2007).

Metody druhé generace sekvenování byly objeveny v 90. letech minulého století a komerčně se začaly využívat od roku 2004 (Zhou et al., 2010). Vzniklé metody využívají různé pufrы a enzymy pro izolaci sekvence DNA. Metody mají však společné kroky přípravy templátu, určení bází a analýzu dat. Jelikož existuje v dnešní době mnoho metod určení jedné dané sekvence DNA, můžeme výsledky různých metod mezi sebou porovnat. Firmy dodávající příslušné přístroje sice uvádějí kvalitu jednotlivých čtení sekvencí, neexistuje však studie či jiný materiál, které by kvalitativně zhodnotily rozdíly v daných metodách (Metzker, 2010).

Jako první komerčně dostupnou metodou tzv. nové generace sekvenování (NGS) se stalo pyrosekvenování 454. Jde o metodu asymetrickou a cyklickou. Jedná se o sérii enzymatických reakcí, které postupně začleňují dusíkaté báze nukleotidů do vznikajícího

řetězce DNA. Při zabudování jednotlivých bází dochází k emitaci viditelného světla. Celá metoda spočívá v přípravě krátkých dvouvláknových úseků DNA, které jsou na každém z konců označeny různými adaptory. Na 5' konci je navázán biotin. Ten se váže na streptavidin ve formě malé magnetické koule. Tím je získána jednovláknová templátová DNA. Tyto jednovláknové úseky DNA se komplementárně vážou k další magnetické kouli s úsekem DNA. Mikrokulička je uložena v suspenzi s vodou a olejem, kde se nachází komponenty potřebné k úspěšné polymerázové řetězové reakci (PCR) jako jsou volné nukleotidy a DNA polymeráza. Kapičky jsou směs mikroreaktorů, ve kterých dochází k paralelní amplifikaci DNA a vyrobení přibližně 10^7 kopií templátu na mikrokuličku. Mikrokulička s navázanou jednořetězcovou DNA tak tvoří jednu zkumavku na PCR, kde probíhá amplifikace daného úseku DNA. Kuličky s amplifikovanou DNA se s primerem přenesou na pikotitrační desky (PTP). Do jedné jamky se vejde přesně a pouze jedna kulička. Na PTP je nanášena směs sulfurylázy, luciferázy, apyrázy, DNA polymerázy a APS s luciferinem. Enzymatická reakce postupně zabudovává jednotlivé nukleotidy v daném stanoveném pořadí. Kvůli přeměně luciferinu na oxyluciferin jamky se zabudovaným nukleotidem světélkují. Toto světélkování zachytává výkonná kamera a data zpracovává určitý software. Mezi hlavní výhody pyrosekvenování patří možnost celogenomického čtení a vysoká rychlost. Nevýhodami jsou vysoká cena kompartmentů a problémy s detekcí polyúseků DNA jako je TTTT či CCCC (Shokralla et al., 2012; Metzker, 2010).

Další novou metodou sekvenování je technika firmy Solexa (později odkoupena firmou Illumina), vynalezena v roce 2007. Tato metoda je založena na hybridizaci templátové DNA na opticky odrazném pevném povrchu reakční cely za využití modifikovaných nukleotidů. Templát je fragmentován na velikosti menší než je 800 bp. Oba konce templátu jsou zarovnány, adenylovány a jsou k nim připojeny adaptory. Proběhne tepelná denaturace a templátová DNA s adaptorem je kompatibilně připojena k druhému adaptoru v reakčním boxu, kde následně proběhne amplifikace. Po PCR je templát odmyt z cely. Nové vlákno hybridizuje s adaptory a zároveň se ohýbá. Takto vytvořený jednovláknový můstek je amplifikován za vzniku dvouvláknového můstku. Tento proces se cyklicky opakuje a je označován jako „Bridge amplification“. Tyto můstky jsou denaturovány, druhé řetězce jsou vymyty z cely a na povrchu zůstanou milióny identických kopií DNA. Následná sekvenace je založena na integraci fluoreskujícího nukleotidu s inaktivovaným 3' uhlíkem. Tím je zajištěna integrace pouze jednoho nukleotidu do řetězce. Opakující se sekvenace je vyhodnocována CCD kamerou, která následně určuje pořadí bází. V dnešní době existují různé přístroje typu

Illumina pro sekvenování celých genomů či určitých oblastí genů. Nejčastější chybou vyskytující se při této metodě je substituce nukleotidu, která vzniká při nesprávném odebrání a přiřazení terminační skupiny, což vede k nekompetentnímu prodloužení vlákna. Tato metoda je rychlejší a cenově efektivnější než Sangerova metoda, má však také větší chybovost. V dnešní době však díky cenové dostupnosti na trhu naprosto převládá tato metoda sekvenování (Shokralla et al., 2012; Zhou et al., 2010).

Poslední zmíněná metoda spadající do druhé generace sekvenování je metoda ion torrent. Tato metoda byla představena v roce 2010. Nevyužívá optickou signalizaci jednotlivých nukleotidů, ale využívá změnu pH u reakce polymerázy při syntéze nového řetězce DNA dle jeho templátu. Celá reakce probíhá na polovodiči, který je pokryt mikrojamkami, pod kterými je vrstva citlivá na přítomnost iontů. Zabudování nukleotidů uvolní H⁺ ionty, čímž se změní pH. Probíhající PCR v jednotlivých jamkách, kde se nachází pouze jedna DNA, zaznamenává detektor citlivý právě na změnu pH. Jednotlivé nukleotidy jsou přidávány na polovodič a dochází k syntéze nového vlákna. Pokud je daný nukleotid komplementární a naváže se, detektor zaznamená změnu pH. Tato metoda je nejlevnější, velmi rychlá a jednoduchá na obsluhu (Liu et al., 2012; Shokralla et al., 2012).

Sekvenční metody druhé generace jsou k dnešnímu dni nejvíce využívanými metodami pro sekvenování DNA. Společné je pro ně příprava NGS knihoven, amplifikace DNA, jejich celková levnost a přesnost sekvenování. K nevýhodám patří vyšší IT náročnost na obsluhu a délka sekvenace jedné DNA která se pohybuje okolo 800 bp (Ari et Arikan, 2016).

3.5.3 Třetí generace sekvenování

Nastupující metodou sekvenování je sekvenace jednotlivých molekul DNA. Na rozdíl od předešlých metod nevyužívá pro sekvenaci amplifikaci DNA, čímž se výrazně zkracuje doba sekvenace. Přesnost a citlivost metody je prozatím na malé úrovni. Chybovost se pohybuje kolem 10 – 15 %. Tento podíl je možné zmenšovat opakováním celé metody se stejnou sekvencí DNA (Xuan et al., 2013; Ari et Arikan, 2016).

SMRT (single-molecule real time) vyvinuta Pacific Bioscience využívá destičky s nanojamkami o velikosti kolem 10 nm. Po začlenění floreskujícího nukleotidu pomocí polymerázy ukotvené na dně jamky, je uvolněna energie v podobě záblesku. Typ záblesku určuje typ zabudovaného nukleotidu. Tento postup nevyžaduje promývací část při začlenění

jednotlivých nukleotidů jako je tomu u technologie firmy Illumina, tudíž se sekvenace velice zrychluje. V dnešní době přístroje využívající SMRT jsou schopny sekvenace úseků DNA dlouhých až 50000 bp, běžně kolem 15000 bp (Liu et al., 2012; Carneiro et al., 2012).

Další novou metodou je využití nanopórů při sekvenování. Tento koncept byl vytvořen již v 90. letech minulého století. Metoda je založena na vlastnostech nanopóru, kdy je využita jejich možnosti výměny iontů mezi dvěma elektrolyty. Přes nanopór proudí konstantní proud. Analytem je jednovláknová molekula DNA. Jak prostupuje DNA nanopórem, dochází k detekci jednotlivých nukleotidů. Tato metoda využívá opakující možnost čtení DNA, pro dosažení větší citlivosti a správnosti čtení. Jednotky DNA mohou být dlouhé až několik desítek kilobází. Mezi hlavní nevýhodu se řadí příliš velká rychlost vedení DNA přes nanopór. Nynější studie se zaměřují na zpomalení průchodu DNA pro detailnější sekvenaci (Jain et al., 2016). Tato metoda zatím na trhu není moc častá, protože neexistuje cenově dostupný sekvenátor. Firma Oxford Nanopore před 5 lety vyvinula sekvenátor, který je možný přečíst lidský genom během 15 minut. Komerčně však není dostupný (Di Fiori et al., 2013; Li et al., 2015).

3.6 Chybovost dat

Chyby v genotypizaci byly a jsou časté. Kvůli velkému množství dat, které se vytváří v daném oboru genetiky, není zcela možné zamezit tvorbě chyb. Chyba může být zjištěna jako nesoulad experimentálního vzorku se známým genotypem nebo při opakování sekvenace DNA postupem času. Předpokládá se, že míra chybovosti se pohybuje okolo 1 % všech studií (Göring et Terwilliger, 2000). Reálně se odhaduje, že 16 % všech studií obsahují minimálně jednu mutaci v jednom nukleotidu (SNP) (Carlson et al., 2005).

Příčiny vzniku chyby při genotypizaci mohou být rozdílného původu. Objevení chyby je ta snazší část. Problémem je příčina vzniku dané chyby. Existují 4 kategorie: Chyby spojené se samotnou sekvencí templátové DNA, chyby způsobené malou kvalitou či nedostatkem DNA, chyby spojené s biochemickými artefakty a jinými nečistotami a důležitou roli zde hraje i lidský faktor (Pompanon et al., 2005).

Při chybě spjaté se sekvencí DNA nejčastěji dochází k tomu, že poblíž markeru dojde k mutaci (pokud detekujeme daný marker). U mikrosatelitů se pak nejčastěji jedná o chybu výskytu nulových alel, kdy selže amplifikace alely v důsledku mutace, která je lokalizována na komplementární sekvenci jednoho z primerů (Paetkau et Strobeck, 1995).

Nízké množství a špatná kvalita DNA mohou vést k tvorbě chyb. Nízký počet izolované DNA v extraktu, který je zapříčiněn velkým zředěním nebo degradací molekuly DNA vede k tvorbě chyb. Tyto vlastnosti také dávají větší šanci vzniku kontaminace, kdy vzniká nechtěný amplikon z nečistoty, namísto z templátové DNA (Pompanon et al., 2005).

Artefakty vznikají nejčastěji v elongační fázi PCR, kdy má *Taq* polymeráza tendenci přidávat k syntetizovanému řetězci netemplátový nukleotid (nejčastěji adenin). Tento úkaz je celkem běžnou vyskytující se chybou. Omezit se nejspíše dá kalibrací doby elongační části PCR (Pompanon et al., 2005).

Lidský faktor běžně ovlivňuje výskyt chyb při určení genotypu. Ať už se jedná o špatné pipetování či kontaminaci vzorku. Jedná se o nejčastější typ chyb, kterému se nejhůře předchází. Často hraje roli subjektivita vyhodnocování člověka při porovnání nesrovnalostí např. v AFLP (Pompanon et al., 2005).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část diplomové práce byla získána semena máku setého (viz. tabulka níže) z genové banky v Opavě, Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) v Praze a z Výzkumné stanice v Červeném Újezdě. Ve skleníku v areálu ČZU byly za standardních podmínek ze semen vypěstovány rostliny do fáze DC 25, kdy rostliny mají 3-4 páry pravých listů. Z listů byla následně izolována DNA.

Tabulka 1 Seznam odrůd máku setého

1	–	FLORIAN	(Genobanka Opava)
2	–	GERLACH	(Genobanka Opava)
3	–	ROSEMARIE	(Genobanka Opava)
4	–	OPAL	(Genobanka Opava)
5	–	SOKOL	(Genobanka Opava)
6	–	POSTOMI	(Genobanka Opava)
7	–	ORFEUS	(Genobanka Opava)
8	–	MALSAR	(Genobanka Opava)
9	–	MAJOR	(Genobanka Opava)
10	–	ALBÍN	(Genobanka Opava)
11	–	KÉK DUNA	(Genobanka Opava)
12	–	RACEK	(Genobanka Opava)
13	–	ZENO	(Genobanka Opava)
14	–	KOSMOSZ	(Genobanka Opava)
15	–	AMETISZT	(Genobanka Opava)
16	–	MARIANNE	(Genobanka Opava)
17	–	BERGAM	(Genobanka Opava)
18	–	REDY	(Genobanka Opava)
19	–	DANISH FLAG	(maloobchod)
20	–	BUDDHA	(Genobanka Opava)
21	–	KORNEUBURGER	(Červený Újezd)
22	–	AKVAREL	(Červený Újezd)
23	–	ORBIS_II	(ÚKZÚZ)
24	–	OPEX_II	(ÚKZÚZ)
25	–	ONYX_II	(ÚKZÚZ)
26	–	LAZUR	(Genobanka Opava)
27	–	BERGAM_II	(ÚKZÚZ)
28	–	RACEK_II	(ÚKZÚZ)
29	–	OPÁL_II	(ÚKZÚZ)
30	–	MARATON	(Genobanka Opava)
31	–	OREL	(Genobanka Opava)

4.1.1 Izolace DNA

Izolace DNA z listů máku setého byla provedena za pomoci komerčního kitu DNeasy Plant MiniKit společnosti Qiagen podle protokolu výrobce:

- 1) Okolo 100 mg listu bylo přeneseno do zkumavek, zmrazeno v tekutém dusíku a následně rozdrceno skleněnou tyčinkou.
- 2) Do každé zkumavky s rozmělněným materiálem bylo přidáno 400 μ l pufru AP1, následně 4 μ l RNase A. Vše bylo krátce zvortexováno.
- 3) Vzorky poté homogenizovány na vibrační třepače a uloženy na 10 minut do termobloku při teplotě 65 °C. Během inkubace byly vzorky průběžně znovu 2x až 3x homogenizovány ručně převrácením zkumavky.
- 4) Dále bylo do zkumavek přidáno 130 μ l pufru P3.
- 5) Poté byly vzorky vloženy na 5 minut do mrazničky.
- 6) Vzorky byly centrifugovány při 20 000 x g po dobu 5 minut a následně byl supernatant přemístěn do fialových 2ml zkumavek s filtrem, který zachytával nečistoty.
- 7) Následovala centrifugace při 20 000 x g po dobu 2 minut. Filtrát byl přemístěn do běžných zkumavek.
- 8) Byl přidán 1,5 násobek objemu supernatantu (675 μ l) AW1 pufru s etanolem.
- 9) Vzorky byly přepipetovány do bílých zkumavek s filtrem, které byly součástí kitu, a centrifugovány 1 minutu při 6 000 x g. Při tomto kroku byla DNA navázána na filtr.
- 10) Filtry byly přemístěny do nových zkumavek, které byly součástí kitu.
- 11) Následně bylo přidáno 500 μ l AW2 pufru s etanolem a byla provedena centrifugace 1 minutu při 6 000 x g.
- 12) Po přelití filtrátu do odpadní kádinky byl krok 11 zopakován.
- 13) Po opětovném vylití filtrátu byla provedena centrifugace „na sucho“ po dobu 2 minut při 20 000 x g.
- 14) Filtry byly přemístěny do čistých zkumavek a bylo přidáno 50 μ l AE pufru, který byl předem předehřán na 65 °C.
- 15) Vzorky s pufrem byly inkubovány po dobu 5 minut v centrifuze za pokojové teploty a poté centrifugovány 1 minutu na 6 000 x g. Tímto krokem byla zajištěna eluce DNA z filtru do pufru.

- 16) Do zkumavek bylo přidáno dalších 50 μ l předeřátého AE pufru a opakování kroku 15.
- 17) Pro konzervaci izolované DNA byly vzorky zmrazeny v klasické mrazničce.

4.1.2 Kvalita a kvantita izolované DNA

Ve všech zkumavkách s izolovanou DNA byla stanovena koncentrace prostřednictvím UV spektrofotometru S111107 NanoPhotometer od společnosti Implen. Měření probíhalo s poměrem absorpance A_{260}/A_{280} . Čistá DNA je stanovena hodnotou od 1,8 do 2,1, menší hodnota ukazuje na přítomnost proteinů či jiných nečistot. Následně byly vyhovující vzorky naředěny na konečnou koncentraci 10 ng/ μ l.

4.2 Bioinformatická analýza

Na začátku byla uskutečněna bioinformatická analýza. Pro návržení primerů byla stažena data ze sekvenční databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pro vybrané geny syntetizující morfinové alkaloidy u máku setého. Alignment CDS sekvencí byl vykonán za pomoci online programu BLAST-N verze 2.7.1+ (Camacho et al., 2009). Program pracoval dle algoritmu pro porovnání diskontinuální sekvence, jelikož genomická a EST sekvence se od sebe liší.

4.2.1 Design primerů

Nové primery byly designovány k nalezení oblastí intronů, jelikož lze předpokládat polymorfismus spíše v těchto oblastech. Primery byly navrženy pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen et Skaletsky, 1999; Untergasser et al., 2012). Parametry designu primerů byly ve výchozím nastavení. Jednotlivé sekvence primerů jsou vyznačeny v tabulkách 2, 3 a 4 níže.

Tabulka 2 Navržené primery pro gen *COR1*

velikost dle CDS	pozice dle CDS	CoR1			
247 bp	049-295	CoR1v01-F	TTCGGATGCCTGCTTTAGGT	CoR1v01-R	ACAAGATCAGCGTGAGCATC
187 bp	124-310	CoR1v02-F	TGAAAGCGATAGAGGTCGGT	CoR1v02-R	TGAAGAGCAGGGAGGACAAG
164 bp	560-723	CoR1v03-F	GAATCAAGTGGAGATGAGCCC	CoR1v03-R	CCACAGCAATCTGGTGAAGC
425 bp	352-776	CoR1v04-F	ATTTGATACACCATCCGGTAAGC	CoR1v04-R	GCCTTGCTGGTAAACCCATC
181 bp	757-937	CoR1v05-F	GATGGGTTTACCAGCAAGGC	CoR1v05-R	TTGAAAGGTCCAGTCGGTGA
152 bp	705-756	CoR1v06-F	CTTCACCAGATTGCTGTGGC	CoR1v06-R	TCTGCCGTTAGTTCCCAATCA
889 bp	049-937	CoR1v01-F	TTCGGATGCCTGCTTTAGGT	CoR1v05-R	TTGAAAGGTCCAGTCGGTGA
957 bp	049-1005	CoR1v01-F	TTCGGATGCCTGCTTTAGGT	CoR1v07-R	TGACAGTCCTCACTTACCATCT
1032 bp	004-1035	CoR1v08-F	AAATGGAGAGTAATGGTGTACCT	CoR1v08-R	CAAAACGGAGGGAAAAACTGA
935 bp	102-1036	CoR1v09a-F	AACCTTGGTCTAATAAGATCTCGG	CoR1v09a-R	TTCACCACAAGATTTCGCA
941 bp	100-1040	CoR1v09b-F	TCAACTTGGTCTAATAAGATCTCGG	CoR1v09b-R	ACTTTTCACCACAAGATTTCGCA
937 bp	100-1036	CoR1v10a-F	TCAACTTGGTYTAATAAAATCTCGA	CoR1v10a-R	TTCACCACAAGACTCGCG
941 bp	98-1038	CoR1v10b-F	CTTCAACTTGGTYTAATAAAATCTCGA	CoR1v10b-R	TTTTACCACAAGACTCGCG
690 bp	347-1036	CoR1v11-F	CAAATTGGAGTATCTTGATACACTT	CoR1v09a-R	TTCACCACAAGATTTCGCA
813 bp	081-893	CoR1v14-F	CATGGAAAAAGGAAGTAAAC	CoR1v14-R	TTGCAATATGCTCTCAAATTC
454 bp	340-793	CoR1v12-F	ATCTTGATCTATATTTGATACACCA	CoR1v10a-R	TTCACCACAAGACTCGCG
533 bp	085-617	CoR1v13-F	CAATGGTAAAAGGAACAGAAAG	CoR1v13-R	CTTGCAATATTCCCTCAGATTT
529 bp	089-617	CoR1v15-F	GGTAAAAGGAACAGAAAGAGAGAA	CoR1v13-R	CTTGCAATATTCCCTCAGATTT

Tabulka 3 Navržené primery pro gen *CODM*

velikost dle CDS	pozice dle CDS	CODM			
150 bp	119-268	CODMv01-F	TTGGCTAAACTCACGCTTGC	CODMv01-R	TCCAACACTACGGGTTCTGGAG
279 bp	81-359	CODMv02-F	AGCTAGGCAATGGTTTGTCA	CODMv02-R	TGTCCATCAGTAAAGCGTCG
237 bp	417-743	CODMv03-F	ACGGACAGCAAGATGGAGAT	CODMv03-R	CAAGCTCTGGTCGAGGACAA
233 bp	545-777	CODMv04-F	TTTCCAGAACTCCCTCTGCC	CODMv04-R	CCGCTAAAATCCGAGTGTGAC
374 bp	560-933	CODMv05-F	CTGCCTTTCAGGGAGACACT	CODMv05-R	TGCTCGACGCTACGGTAAAT
437 bp	614-1050	CODMv06-F	ACGGTTGTCTTTGAGATGTTGG	CODMv06-R	AAAGCAGGTGTCTCTGGTGT
324 bp	717-1040	CODMv07-F	ATCCTCCTTGTCTCGACCA	CODMv07-R	TCTCTGGTGTGACCAAGCTC
423 bp	930-1352	CODMv08-F	AGCACCGGGCAGTAGTAAAC	CODMv08-R	ACATCACTTGACCCAAACAGA GT
504 bp	849-1352	CODMv09-F	TCAAACCTCTACCTGATGCGT	CODMv08-R	ACATCACTTGACCCAAACAGA GT
931 bp	119-1049	CODMv01-F	TTGGCTAAACTCACGCTTGC	CODMv10-R	AAGCAGGTGTCTCTGGTGTG
1036 bp	119-1154	CODMv01-F	TTGGCTAAACTCACGCTTGC	CODMv11-R	TGTTCACACTTTCTCACATCCT CA
1188 bp	165-1352	CODMv12-F	CCGGTGAAAGCCCGTTGAAT	CODMv08-R	ACATCACTTGACCCAAACAGA GT
1325 bp	52-1376	CODMv13-F	AGAGTTCATGGAGACACCAAT	CODMv13-R	AAGCAACTTATTTCAACCGTG A
497 bp	75-571	CODMv12-F	CCGGTGAAAGCCCGTTGAAT	CODMv14-R	CTGGTGTGACCAAGCTCGAA

Tabulka 4 Navržené primery pro gen *T6ODM*

velikost dle CDS	pozice dle CDS	T6ODM			
249 bp	031-279	T6ODMv02-F	TCATGGAGAAAAGCAAACCTTATGA	T6ODMv02-R	TGCAAGCAAAATGAAGCCTA
150 bp	130-279	T6ODMv03-F	ACGTATGCGCCAATGAAAAC	T6ODMv02-R	TGCAAGCAAAATGAAGCCTA
234 bp	188-421	T6ODMv04-F	TGAAACCATTCTGTGCATCG	T6ODMv04-R	CCTCCACATCTCCATCTTCC
286 bp	408-693	T6ODMv05-F	GGAGATGTGGAAGGATTTGGA	T6ODMv05-R	TCATCCTCATTGCTTGTGTCC
199 bp	527-727	T6ODMv06-F	AACTCCCAGTGCCTCTCAGG	T6ODMv06-R	GCGAGATTTGGTTGAGGACA
409 bp	496-904	T6ODMv07-F	CACTCCATTTAAGGAAGCCTCA	T6ODMv07-R	TGGTAAATTCCATTAGTCATTATCTCC
190 bp	911-1100	T6ODMv08-F	CGATCACCGGGCAGTAGTAA	T6ODMv08-R	TTTTCCATCGAGCTTCCTTG
313 bp	1056-1368	T6ODMv09-F	GGGGATCTTGTGGAGGAATG	T6ODMv09-R	CAAACACAACGCACCTTTCGAG
971 bp	130-1100	T6ODMv03-F	ACGTATGCGCCAATGAAAAC	T6ODMv08-R	TTTTCCATCGAGCTTCCTTG
884 bp	020-903	T6ODMv10-F	ATTTAGAAAAATCATGGAGA	T6ODMv10-R	GGTAAATTCCATTAGTCATT
931 bp	104-1034	T6ODMv11-F	CACGCTTGCCGAAATTCCAT	T6ODMv11-R	CAAAGCAGGTGTCTCTGGAGT
969 bp	130-1098	T6ODMv03-F	ACGTATGCGCCAATGAAAAC	T6ODMv12-R	TTCCATCGAGCTTCCTTGTTTTAC
987 bp	48-1034	T6ODMv13-F	CTTATGAAGCTAGGTAATGGTATGGA	T6ODMv13-R	CAAAGCAGGTGTCTCTGGAGTA
884 bp	189-1072	T6ODMv14-F	GAAACCATTCTGTGCATCGATATAG	T6ODMv14-R	TCCTCCACAAGATCCCCATAT
891 bp	186-1076	T6ODMv15-F	CATGAAACCATTCTGTGCATCGATATAG	T6ODMv15-R	ACATTCCTCCACAAGATCCCCATAT
849 bp	228-1167	T6ODMv16-F	CCAGAACCAATAATCGGAAAGTTAGAATTA	T6ODMv15-R	ACATTCCTCCACAAGATCCCCATAT
300 bp	357-686	T6ODMv17-F	GGTTTCTTTAACCTTTCTATGG	T6ODMv17-R	CATTGCTTGTGTCCCATCTAT
472 bp	357-828	T6ODMv17-F	GGTTTCTTTAACCTTTCTATGG	T6ODMv18-R	AAATCCATGTCCCCTCTC

4.3 PCR

Testováním byla stanovena optimalizovaná amplifikace navržených primerů. Testování amplifikace primerů probíhalo v termocykleru C – 1000 společnosti BioRad. Podmínky amplifikace jsou znázorněny níže v tabulce:

Tabulka 5 PCR program Asch9v2

Asch9v2			
	Čas	Počet cyklů	teplota
před-denaturace	900 s	1x	95 °C
denaturace	30 s	35x	94 °C
anelace	90 s	35x	60 °C nebo 57 °C
elongace	60 s	35x	72 °C
finální elongace	600 s	1x	72 °C
chlazení	nekonečno	1x	12 °C

Složení reakční směsi o celkovém objemu 10 µl bylo následující: 1x Multiplex PCR Plus kit od společnosti Qiagen, 20 ng izolované DNA, 0,2 µM F primeru, 0,2 µM R primeru a zbytek objemu byl doplněn H₂O pro PCR.

4.4 Agarózová elektroforéza

Pro testování výsledku PCR byla použita agarózová elektroforéza. Separace fragmentů DNA probíhala v 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru s elektrickým napětím 4 V / cm³. Orientační velikost ampliconů byla zjištěna pomocí hmotnostního standardu GeneRuler 100bp od firmy Thermo Fisher Scientific.

4.5 Sekvenování DNA

Sekvenování PCR produktů bylo provedeno pomocí modifikované Sangerovy metody (Sanger et al., 1977).

4.5.1 Purifikace DNA z gelu

Před vlastní sekvenací byla DNA kvantifikována a kvalifikována. Produkty PCR byly separovány na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru s el. napětí 4 V*cm⁻¹ po dobu 40

minut. Následně byly produkty vyříznuty pod UV lampou skalpelem a přečištěny kitem GeneJET Gel Extraction Kit od Thermo Fisher Scientific.

- 1) Gel s PCR produktem byl přenesen do zkumavky.
- 2) V závislosti na váze gelu byl do zkumavky přidán Binding pufr v poměru 1:1.
- 3) Následně se směs ve zkumavkách inkubovala 10 minut v termobloku při teplotě 60 °C. Směs v průběhu inkubace byla několikrát homogenizována pomocí vibrační třepačky.
- 4) Směs byla kvantitativně přenesena do GeneJet zkumavky s filtrem a centrifugována 1 minutu při 12 000 x g.
- 5) Supernatant byl odlit a do kolonky s filtrem bylo napipetováno 100 µl Binding pufru a centrifugováno 1 minutu při 12 000 x g.
- 6) Po opětovném odlití filtrátu bylo do kolonky přidáno 700 µl Washing pufru s etanolem a centrifugováno 1 minutu při 12 000 x g.
- 7) Po odlití supernatantu byla provedena centrifugace na sucho po dobu 1 minuty při 20 000 x g. Tento krok odstranil rezidua etanolu po předešlém kroku.
- 8) Kolonky s filtrem byly přemístěny do nových 1,5 ml zkumavek a do kolonek bylo napipetováno 25 µl H₂O pro sekvenaci o pH 8,1.
- 9) Takto izolovaný a purifikovaný fragment DNA byl skladován v mrazničce při -20 °C.

4.5.2 Sekvenační reakce

Reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala: 20 až 40 ng DNA, 1x sekvenační pufr od Life Technologies, 3,2 µM F nebo R primer a 2 µl sekvenační směsi BigDye Terminator v3.1 od Life Technologies.

Pro sekvenační reakci byly používány 2 teplotní profily dle T_a daného primeru (viz. tabulky 6 a 7).

Tabulka 6 První teplotní profil

T_a 1			
	Čas	Počet cyklů	teplota
<i>před-denaturace</i>	60 s	1x	96 °C
<i>denaturace</i>	10 s	25x	96 °C
<i>annealing</i>	90 s	25x	50 °C
<i>elongace</i>	240 s	25x	60 °C
<i>finální elongace</i>	600 s	1x	60 °C

Tabulka 7 Druhý teplotní profil

T_a 2			
	Čas	Počet cyklů	teplota
<i>před-denaturace</i>	60 s	1x	96 °C
<i>denaturace</i>	10 s	25x	96 °C
<i>annealing + elongace</i>	240 s	25x	60 °C
<i>finální elongace</i>	600 s	1x	60 °C

Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky ochlazeny na 12 °C a poté použity v dalších analýzách nebo uloženy v mrazících boxech.

4.5.3 Purifikace po sekvenční reakci

Purifikace vzorků po sekvenační reakci se skládala z těchto kroků:

- 1) Bylo přidáno a promícháno 2 µl glykogenu od Thermo Fisher Scientific, 50 µl 96% ethanolu a 2 µl 3M octanu sodného.
- 2) Poté následovala inkubace vzorků 15 minut při pokojové teplotě.
- 3) Následně proběhla centrifugace po dobu 30 minut při 13 000 x g.
- 4) Supernatant byl opatrně odpipetován bez účasti usazeniny na dně. Následně bylo přidáno 200 µl 70% etanolu.
- 5) Vzorky byly centrifugovány po dobu 15 minut při 13 000 x g.
- 6) Opakování bodu 4 a 5.
- 7) Po centrifugaci byly vzorky sušeny při teplotě 50 °C po dobu 30 minut.
- 8) Do každé zkumavky se přidalo 12 µl Hi-Di formamidu od Life Technologies.
- 9) Na konci proběhla denaturace všech vzorků v termocykleru C – 1000 od Bio-Rad při teplotě 95 °C po dobu 5 minut.

4.5.4 Sekvenace

Daná sekvenace byla provedena v genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 od Life Technologies, separací v 61 cm kapiláře s POP6 polymerem v 1x Running pufru od Life Technologies. V Data Collection Software 3.1.0 byl seřízen KB_310_POP6_(BDv3)_50Std DyeSet a jako základní modul byl nastaven Seq POP6 (1mL)E. Doba nástřiku se pohybovala mezi 15 až 30 sekundami při el. napětí 2,5 kV. Separace probíhala při 12 kV za teploty 50 °C přibližně 60 až 100 minut v závislosti na předpokládané délce DNA fragmentu. Zajištění kvalitní sekvenace byly všechny fragmenty DNA sekvenovány oboustranně.

4.5.5 Analýza sekvenčních dat

Hrubá sekvenční data vyhodnocena za pomoci softwaru Sequencing Analysis 5.2.0 (Thermo Fisher Scientific), který vyhodnotil kvalitu sekvenace jednotlivých nukleotidů. U pseudogenu *CORI* následovala analýza pomocí Variant Reporter 1.1.0 (Thermo Fisher Scientific), který umožňuje složení sekvencí od F a R primerů a provedení alignmentu vůči referenční sekvenci. Pro osekvenování celého genu *CORI* bylo zapotřebí osekvenovat dva částečně se překrývající produkty PCR, a proto bylo nezbytné vyhodnotit každý amplicon zvlášť a poté provést alignment těchto sekvencí. Pro vícenásobné porovnání všech sekvenovaných odrůd u pseudogenu *CORI* byla použita aktuální online verze softwaru MUSCLE (Edgar, 2004). Manuální úpravy sekvencí všech genů byly provedeny pomocí softwaru BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). K porovnání získaných sekvencí vůči sekvencím uložených v nukleotidové databázi GenBank byla použita online verze softwaru BLAST-N 2.7.1+ (Camacho et al., 2009).

5 Výsledky

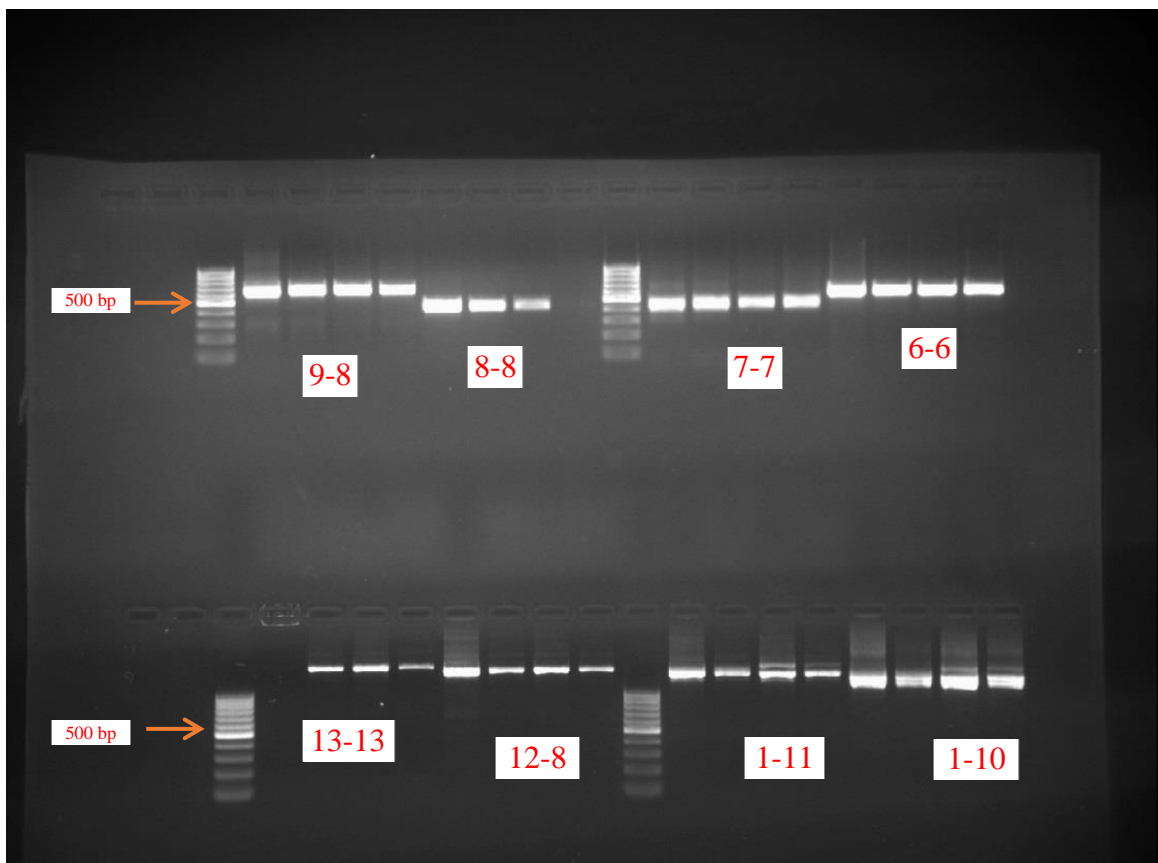
5.1 Výsledky testování primerů

Byly testovány všechny kombinace primerů jednotlivých genů pro vybrané genotypy máku setého. Porovnání amplifikace probíhalo elektroforeticky na agarózovém gelu za použití hmotnostního standardu GenRuler 100bp od Thermo Fisher Scientific. Úspěšnost amplifikace jednotlivých primerů jsou zaznamenány v tabulkách 8, 9 a 10. Pro sekvenaci byly vybrány pouze kvalitně amplifikující produkty, které jsou vyznačeny zeleným stínováním řádku s danou variantou primerů.

5.1.1 Výsledky amplifikace primerů pro gen *CODM*

Tabulka 8 Úspěšnost amplifikace primerů pro *CODM*

Očekávaná velikost	Pozorovaná velikost	Primer F	Primer R
150 bp	150-200	V01-F	V01-R
279 bp	350-400	V02-F	V02-R
237 bp	650-700	V03-F	V03-R
233 bp	400, 500, >1000	V04-F	V04-R
374 bp	500	V05-F	V05-R
437 bp	500	V06-F	V06-R
324 bp	450-500	V07-F	V07-R
423 bp	450-500	V08-F	V08-R
504 bp	600-700	V09-F	V08-R
931 bp	>1000	V01-F	V10-R
1036 bp	>1000	V01-F	V11-R
1188 bp	>1000	V12-F	V08-R
1325 bp	>1000	V13-F	V13-R

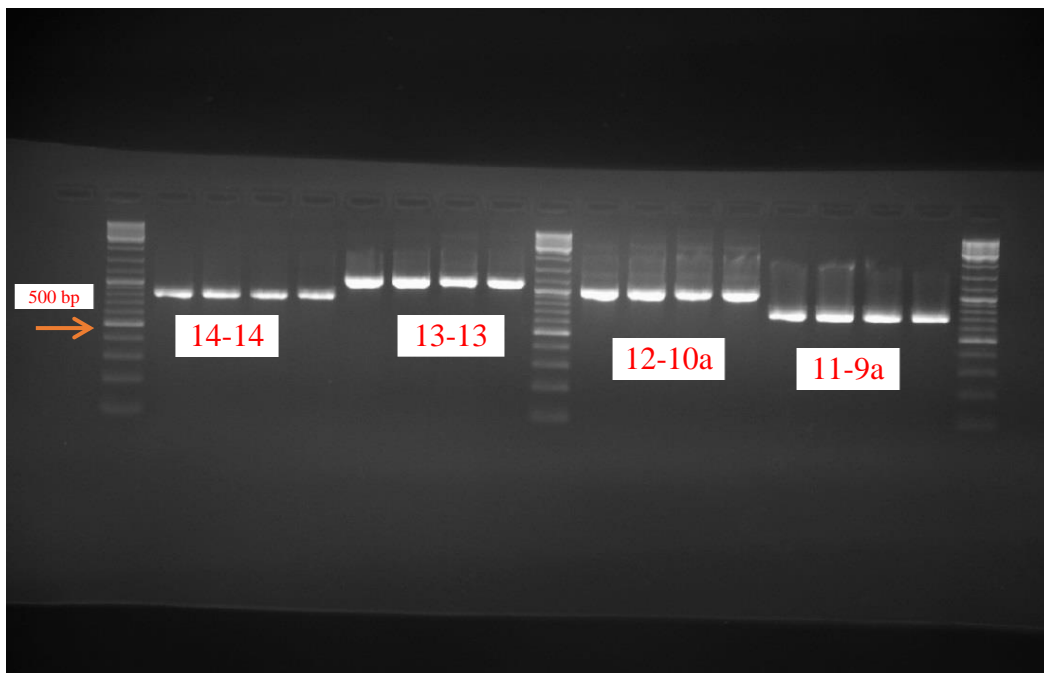


Obrázek 3 *CODM* - Varianty primerů: 6-6, 7-7, 8-8, 9-8 a 1-10, 1-11, 12-8, 13-13, 4 genotypy; hm. st. 100bp

5.1.2 Výsledky amplifikace primerů pro gen *CORI*

Tabulka 9 Úspěšnost amplifikace primerů pro *CORI*

Očekávaná velikost	Pozorovaná velikost	Primer F	Primer R
247 bp	250-300	V01-F	V01-R
187 bp	200	V02-F	V02-R
164 bp	150-200	V03-F	V03-R
425 bp	1000	V04-F	V04-R
181 bp	200	V05-F	V05-R
152 bp	250	V06-F	V06-R
889 bp	>1000	V01-F	V05-R
957 bp	X	V01-F	V07-R
1032 bp	>>1000	V08-F	V08-R
935 bp	1000	V09a-F	V09a-R
941 bp	X	V09b-F	V09b-R
937 bp	X	V10a-F	V10a-R
941 bp	X	V10b-F	V10b-R
690 bp	700	V11-F	V09a-R
813 bp	800	V14-F	V14-R
454 bp	1000	V12-F	V10a-R
533 bp	1000	V13-F	V13-R



Obrázek 4 *CORI* - Varianty primerů: 11-9a, 12-10a, 13-13, 14-14, 4 genotypy; DNA mix ladder

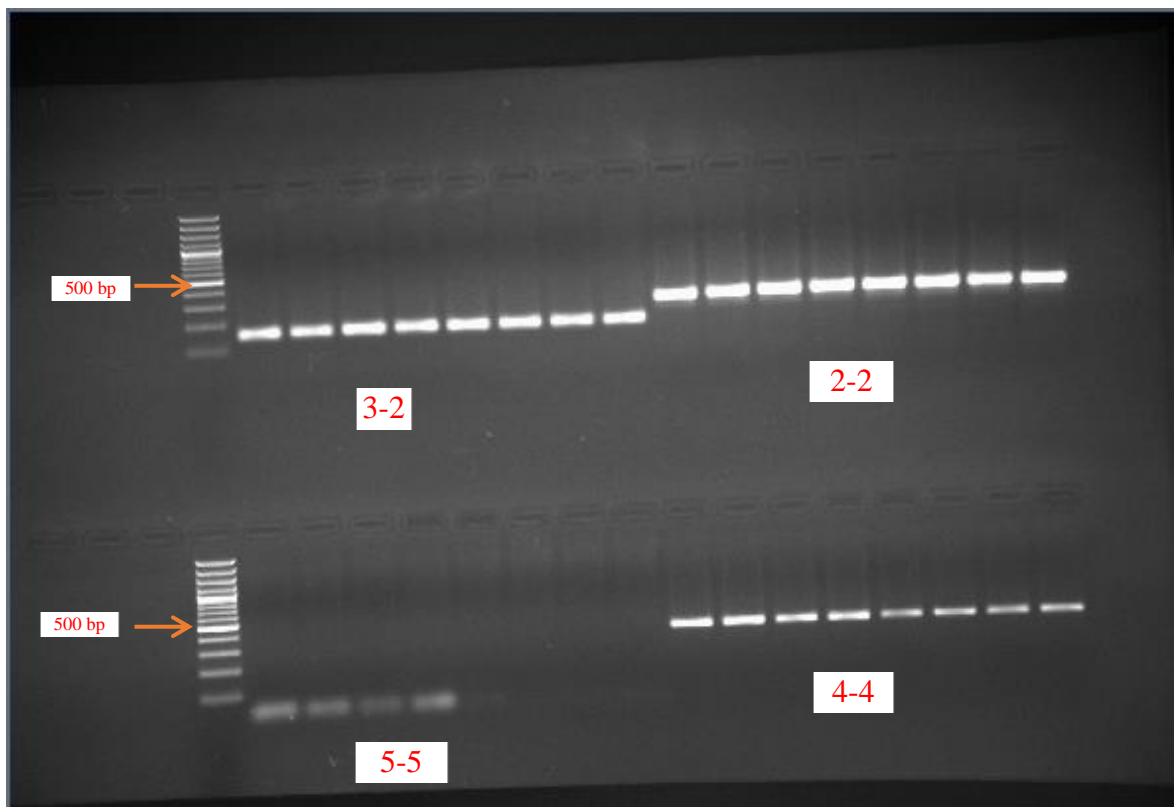
5.1.3

5.1.4 Výsledky amplifikace primerů pro gen *T6ODM*

Tabulka 10 Úspěšnost amplifikace primerů pro *T6ODM*

Očekávaná velikost	Pozorovaná velikost	Primer F	Primer R
249 bp	250	V02-F	V02-R
150 bp	150	V03-F	V02-R
234 bp	300	V04-F	V04-R
286 bp	X	V05-F	V05-R
199 bp	X	V06-F	V06-R
409 bp	X	V07-F	V07-R
190 bp	200	V08-F	V08-R
313 bp	300	V09-F	V09-R

U ostatních primerů u genu *T6ODM* nedocházelo k amplifikaci nebo docházelo k nespecifické amplifikaci.



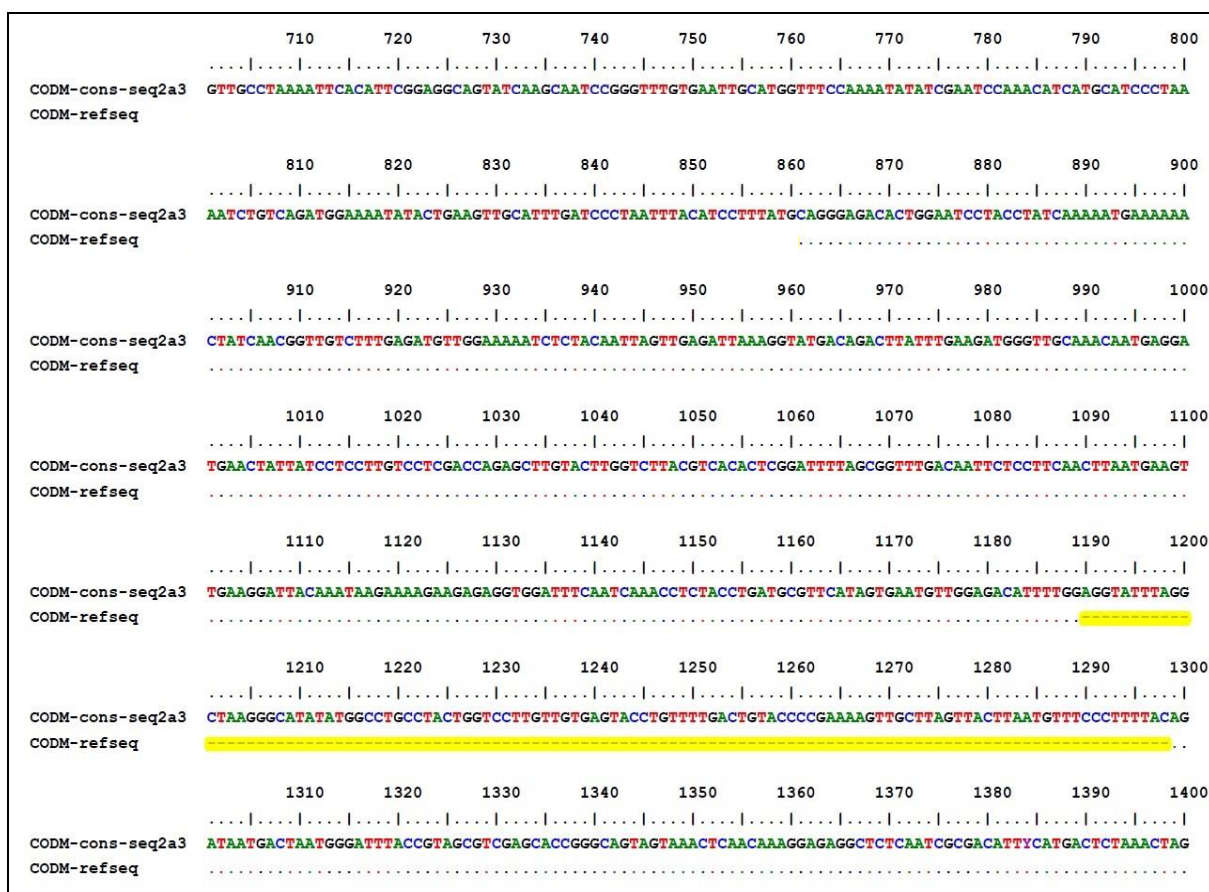
Obrázek 5 *T6ODM* - Varianty primerů: 2-2, 3-2, 4-4, 5-5, různé genotypy; hm. st. 100bp

5.2 Výsledky sekvenování a polymorfismu

Na základě sekvenování a následného skládání vybraných ampliconů byly zkompletovány genomické sekvence vybraných genů. Jednotlivé výsledky genů byly následující. Žlutě jsou vyznačeny úseky intronů.

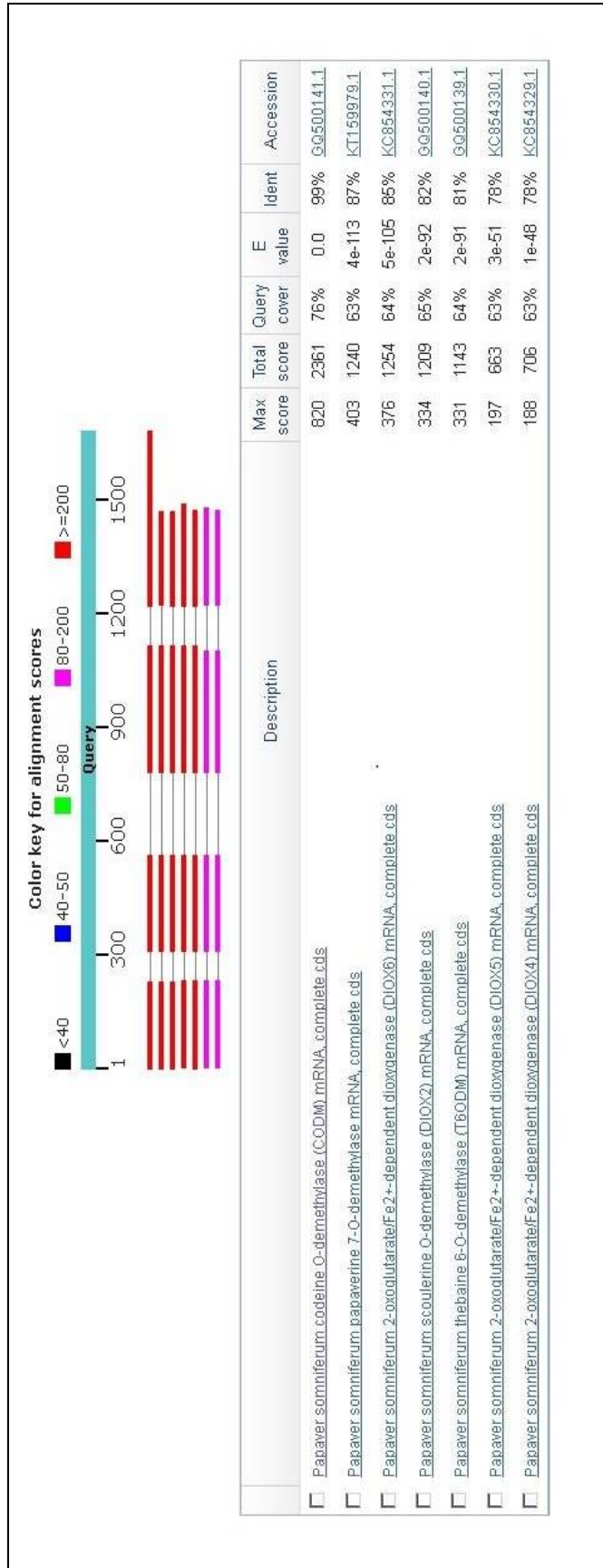
5.2.1 Výsledky sekvenace *CODM*

Obrázek 6 Porovnání sekvenace genu *CODM* s databází



	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
CODM-cons-seq2a3	GTTGCCTAAAATTCACATTGGAGGCAGTATCAAGCAATCCGGGTTTGTGAATGCATGGTTTCCAAAATATATCGAATCCAACATCATGCATCCCTAA									
CODM-refseq									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
CODM-cons-seq2a3	AATCTGTCAGATGGAAAATATACTGAAGTGCATTGATCCCTAATTTACATCCTTATGCAGGGAGACACTGGAATCCTACCTATCAAAAATGAAAAA									
CODM-refseq									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
CODM-cons-seq2a3	CTATCAACGGTTGCTTTGAGATGTTGGAAAATCTCTACAATTAGTTGAGATTAAGGTATGACAGACTTATTTGAAGATGGTTGCAAAACATGAGGA									
CODM-refseq									
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
CODM-cons-seq2a3	TGAACATATATCCTCCTTGCCTCGACCAGAGCTTGTACTTGGTCTTACGTACACTCGGATTTAGCGGTTTGACAATTCCTTCAACTTAATGAAGT									
CODM-refseq									
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
CODM-cons-seq2a3	TGAAGGATTACAAATAAGAAAAGAGAGAGTGGATTTCAATCAAACCTCTACCTGATGCGTTTCATAGTGAATGTTGGAGACATTTGGAGGTTATTTAGG									
CODM-refseq									
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
CODM-cons-seq2a3	CTAAGGGCATATATGGCCTGCCCTACTGGTCCTTGTGTGAGTACCTGTTTGTGACTGTACCCCGAAAAGTTGCTTAGTTACTTAATGTTCCCTTTTACAG									
CODM-refseq									
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
CODM-cons-seq2a3	ATAATGACTAATGGGATTTACCCTAGCGTCGAGCACCAGGAGTAGTAACTCAACAAAGGAGAGGCTCTCAATCGGCACATTCATGACTCTAACTAG									
CODM-refseq									
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
CODM-cons-seq2a3	AGTCAGAAATAGGCCCAATTTTCGAGCTTGGTCACACCAGAGACACCTGCTTTGTTCAAAGAGGTTAGGTATGAGGATATTTTGAAGGAAAATCTTTCAAG									
CODM-refseq									
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
CODM-cons-seq2a3	GAAGCTTGATGGAAAATCATTCTSGACTACATGAGGATGTGAGAAAAGTGTGAACATACATTATACCCACATTTGTTTAAATATATGATGAAATAGTT									
CODM-refseqT.....									
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
CODM-cons-seq2a3	GCTTTTGAAGTATGATGAATTAAGTTGGTTTTGAAGAATTCATATTTGCTTAAATTTCTGGATGACTGAGAGATTTATATGTAATAATAATGATTG									
CODM-refseq									
	1710	1720	1730	1740	1750					
CODM-cons-seq2a3	GTTTGAAGATTCTCGTCTCACTATATGTAAGACTCTGTTTGGGTCAGTGATGTA									
CODM-refseq									

Výsledky sekvenace ukázaly pouze jednu bodovou mutaci v části 1559 v porovnání s referenční sekvencí uvedenou v databázi. Na obrázku 7 je schematicky znázorněno porovnání s CDS sekvencemi ostatních genů máku setého, kdy např. u 7-O-demetylázy je podobnost sekvencí 85 %. Zároveň jsou patrné chybějící oblasti intronů.



Obrázek 7 Porovnání genu *CODM* s ostatními geny v máku setém

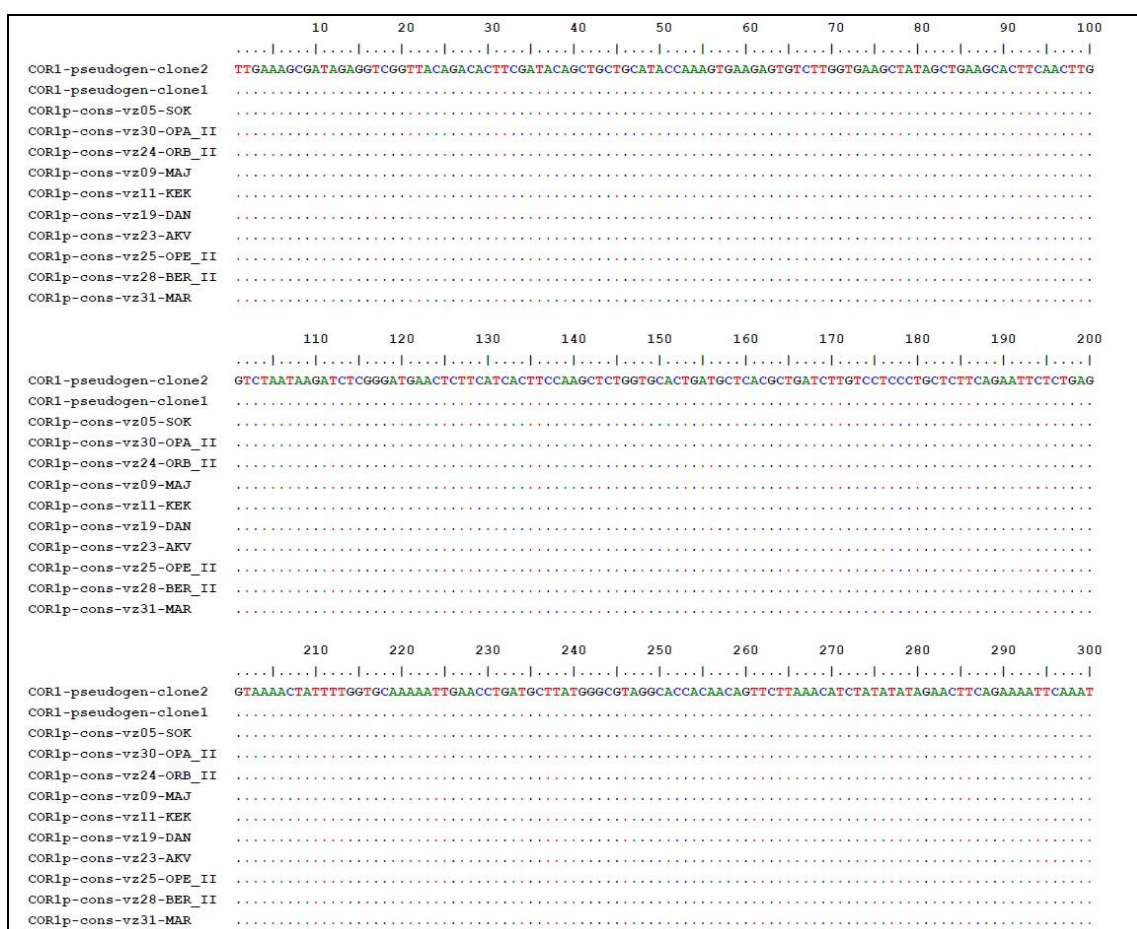
5.2.2 Výsledky sekvenace *COR1*

Obrázek 8 Porovnání sekvence genu *COR1* s *COR1* pseudogenem

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
cor1-clone7-FJ596161.1	AACAGAAAGAGAGAAATTGGCGTTTTTGAAGCGATAGAGGTCGGTTACAGACACTTCGATACAGCTGCTGCATACCAAAGTGAAGAGTGTCTTGGTGAA									
COR1-13Rcomplement (30-1087)	G.....									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158	...T...C...G.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159	...T...C...G.....									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
cor1-clone7-FJ596161.1	GCTATAGCTGAAGCACTTCAACTTGGTTTAAATAAAATCTCGAGATGAACCTTTCATCCTCCCAAGCTCTGGTCGGCTGATGCTCACGCTGATCTTGTCC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158C.....G.....G.....A.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159C.....G.....G.....A.....									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
cor1-clone7-FJ596161.1	TCCTTGCCTTCAGAAATTCCTGAGGTAAAAATATTTGGTGC-AAATCGAACCTATCTAAGGCTTATGTACATAGGCACCAAACTGGATGGAGTTC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158C.....AA...T.....G.T.....GG.G.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159C.....AA...T.....G.T.....GG.G.....									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
cor1-clone7-FJ596161.1	TTAAACATCTATATATAAACTACAGAAATATAAAATGATATTAATTCATCTTGTGTCATATAGGAATCTCAAATGGAGATCTTGTATCTATA									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158G...T...A...C...C.....A...C.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159G...T...A...C...C.....G...A...C.....									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
cor1-clone7-FJ596161.1	TTTGATACCCATCCGGTAAGCTTGAAGCCAGGGAAATTTGTTAAGAAATACCAAAGGATCATATTCCTCCATGGACTACAAAACGTATGGGCAGCC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158TT.....GA.....G.....GT.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159TT.....GA.....G.....GT.....									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
cor1-clone7-FJ596161.1	ATGGAAGAGTGTGAGACCCCTTGGCTTCACTAGGGCAATCGGTGTCAGTAATTTCTCATGCCAAAAGGCTTCAAGAGTTGATGGCAGCAGCCAAAGATCCCTC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158A.....GA.....C.C.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159A.....GA.....C.C.....									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
cor1-clone7-FJ596161.1	CAGTTGTGAATCAAGTGAAGTACAAATTTGCTTAAATCTTACTACACGCTTTGGATAAAATAGTGGTTGCCTTGTTCGACCTTTGACGATAGTTAAT									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158A.A...G.....AG.....T.....G.....G.A...A...G.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159A.A...G.....AG.....T.....G.....G.A...A...G.....									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
cor1-clone7-FJ596161.1	GCCCATTTTTTCGAATATTATAAACACCCTCCATTTTAGTTGACCTTGTATAAATATCCCGGAGTAAAAAATAATTTTTTGTATCAACTTAAGAC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158	...T..A.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159	...T..A.....									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
cor1-clone7-FJ596161.1	AGTTGTTCCATTTTTGGAGTCAAGTTGAGACAATTGCTTCCACTATTGGAGTCAACTTGTATTAAAGTTGGATCCGGGAATAAGTTGTGCTAACTGCTTC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
cor1-clone7-FJ596161.1	CACTTTTAGAAGATATGGGTATTTAAAAGTTGAATAAGGGCAATATCAGAGGTTAGATTTTAAAGCCTATTTAAATAGTGTGCTATCAAATACCACC									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158T...									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159T...									
	1010	1020	1030	1040	1050	1060				
cor1-clone7-FJ596161.1	ATTGACAAGCATTTAGCCCGTATTTCGATTAGAATCTTACAAATGTTGATTGCTTACGA									
COR1-13Rcomplement (30-1087)									
cor1-clone1-pseudogen-FJ596158	T.....T..A.G.....T.....									
cor1-clone2-pseudogen-FJ596159	T.....T..A.G.....T.....									

Při testování kombinací primerů genu *COR1* byla zaznamenána dvojice různých produktů. Na základě sekvenování se zjistilo, že se jedná o amplifikovaný pseudogen genu *COR1*. Jelikož daný pseudogen velmi dobře amplifikoval, byl rovněž sekvenován. Mezi funkčním genem a pseudogenem byla nalezena řada sekvenčních rozdílů (Obrázek 9), především bodových mutací a mikro indelů (insertce/delece). U pseudogenu byly publikovány v databázi dva haplotypy, které byly použity jako referenční sekvence pro alignment. U pseudogenu se podařilo osekvenovat všechny introny, nicméně u samotného genu *COR1* chybí část intronu 3, jedná se přibližně posledních 10 bází, z důvodů nižší kvality sekvenace.

Obrázek 9 Výsledky porovnání sekvenací pseudogenů u 10 různých genotypů máku setého



```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
COR1-pseudogen-clone2  TCATATTAATTCGTCTTGTATGTCACATAGGAATCTCAAATGGGAGTATCTTGATACACTTCCGGTAAGCTTGAAGCCAGGGAAGATTGTTAACGA
COR1-pseudogen-clone1  .....A.....
COR1p-cons-vz05-SOK    .....A.....
COR1p-cons-vz30-OPA_II .....A.....
COR1p-cons-vz24-ORB_II .....A.....
COR1p-cons-vz09-MAJ    .....A.....
COR1p-cons-vz11-KEK    .....A.....
COR1p-cons-vz19-DAN    .....A.....
COR1p-cons-vz23-AKV    .....A.....
COR1p-cons-vz25-OPE_II .....A.....
COR1p-cons-vz28-BER_II .....A.....
COR1p-cons-vz31-MAR    .....A.....

          410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
COR1-pseudogen-clone2  AATACCAAGGATCATATGCTTCCAATGGATGCAAGTCTGTATGGGCAGCCATGGAAAGAGTGTGAGACCTTGGCTTCACTAGGGAATCGGTGTCAGT
COR1-pseudogen-clone1  .....
COR1p-cons-vz05-SOK    .....
COR1p-cons-vz30-OPA_II .....
COR1p-cons-vz24-ORB_II .....
COR1p-cons-vz09-MAJ    .....
COR1p-cons-vz11-KEK    .....
COR1p-cons-vz19-DAN    .....
COR1p-cons-vz23-AKV    .....
COR1p-cons-vz25-OPE_II .....
COR1p-cons-vz28-BER_II .....
COR1p-cons-vz31-MAR    .....

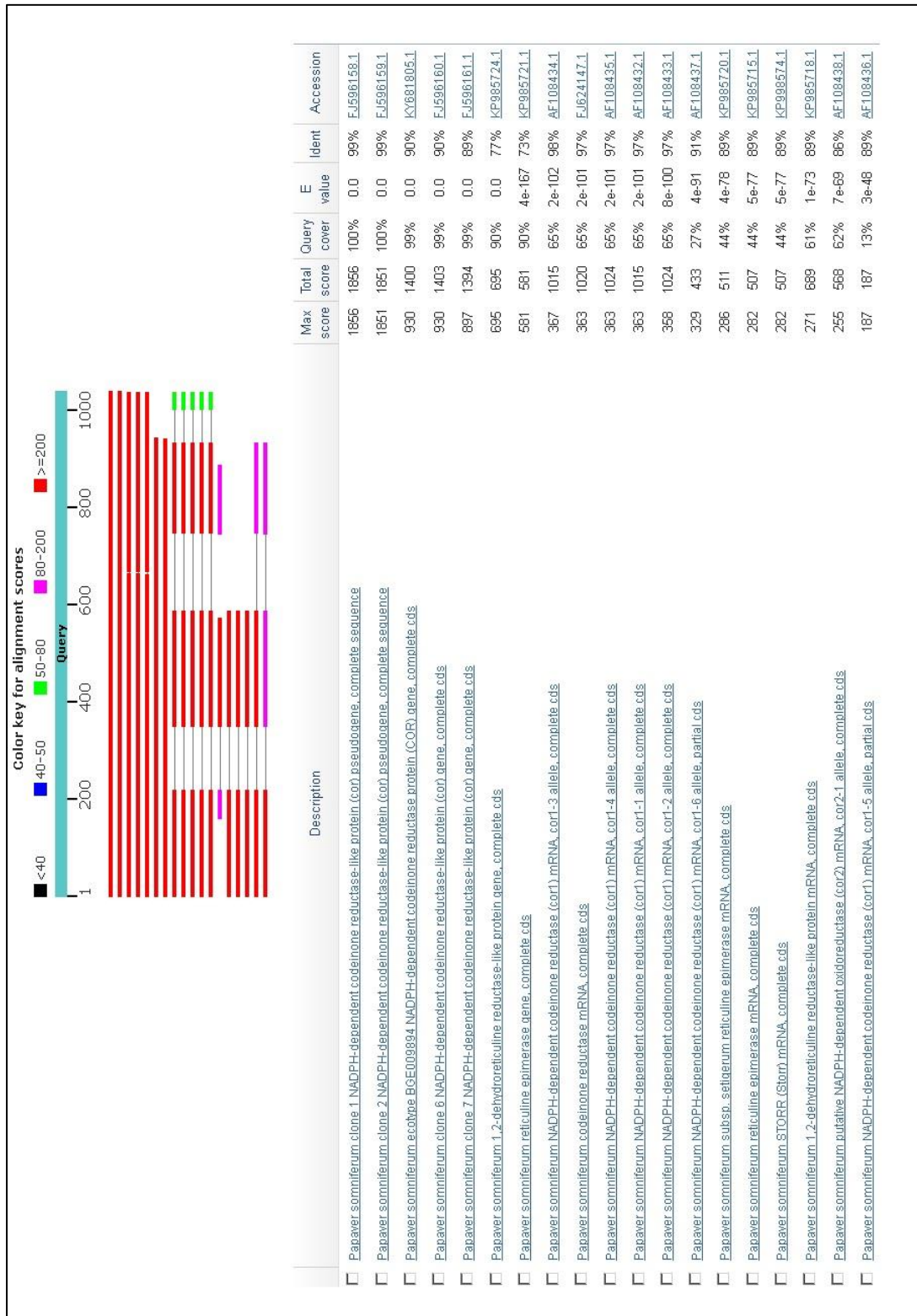
          510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
COR1-pseudogen-clone2  AATTTCTCATGCAAAAAGCTTCAAGAGTTGATGGCGCAGCCCAACCCCTCCAGTTATAAATGAAGTGAGTACAAATAGTCACTTCAACGTTGGATA
COR1-pseudogen-clone1  .....
COR1p-cons-vz05-SOK    .....
COR1p-cons-vz30-OPA_II .....
COR1p-cons-vz24-ORB_II .....
COR1p-cons-vz09-MAJ    .....
COR1p-cons-vz11-KEK    .....
COR1p-cons-vz19-DAN    .....
COR1p-cons-vz23-AKV    .....
COR1p-cons-vz25-OPE_II .....
COR1p-cons-vz28-BER_II .....
COR1p-cons-vz31-MAR    .....

          610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
COR1-pseudogen-clone2  AAAATGGTGGTTGGCATGTTCAAGCTTGGCGATAGTTAATGCTATATTCAAATTACTACCTTTTGACAAGCATTATTGCTCCATGTTGCGATTAGAAATTT
COR1-pseudogen-clone1  .....
COR1p-cons-vz05-SOK    .....
COR1p-cons-vz30-OPA_II .....
COR1p-cons-vz24-ORB_II .....
COR1p-cons-vz09-MAJ    .....
COR1p-cons-vz11-KEK    .....
COR1p-cons-vz19-DAN    .....
COR1p-cons-vz23-AKV    .....
COR1p-cons-vz25-OPE_II .....
COR1p-cons-vz28-BER_II .....
COR1p-cons-vz31-MAR    .....

          710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
COR1-pseudogen-clone2  TACAATGTTGATTGCTTACGATTAAGGTGGAGATGAGCCAGACTTCCAACAAAAGAAATTTGAGAGCATATTGCAAGGCCAATAATATCATGATCACCGC
COR1-pseudogen-clone1  .....
COR1p-cons-vz05-SOK    .....C.....
COR1p-cons-vz30-OPA_II .....C.....
COR1p-cons-vz24-ORB_II .....C.....
COR1p-cons-vz09-MAJ    .....C.....
COR1p-cons-vz11-KEK    .....C.....
COR1p-cons-vz19-DAN    .....C.....
COR1p-cons-vz23-AKV    .....C.....
COR1p-cons-vz25-OPE_II .....C.....
COR1p-cons-vz28-BER_II .....C.....
COR1p-cons-vz31-MAR    .....C.....

          810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
COR1-pseudogen-clone2  ATACTCGGTTTTGGGAGCCGAGGAGCCGATGGGGCAGCAATGCAGTTATGGATTCTAAAGTGTTCCACCAGATTGCTGTGGCCAGAGGAAAATCTGTT
COR1-pseudogen-clone1  .....
COR1p-cons-vz05-SOK    .....
COR1p-cons-vz30-OPA_II .....
COR1p-cons-vz24-ORB_II .....
COR1p-cons-vz09-MAJ    .....
COR1p-cons-vz11-KEK    .....
COR1p-cons-vz19-DAN    .....
COR1p-cons-vz23-AKV    .....
COR1p-cons-vz25-OPE_II .....
COR1p-cons-vz28-BER_II .....
COR1p-cons-vz31-MAR    .....

```

Obrázek 10 Porovnání pseudogenu *COR1* s ostatními geny u máku setého

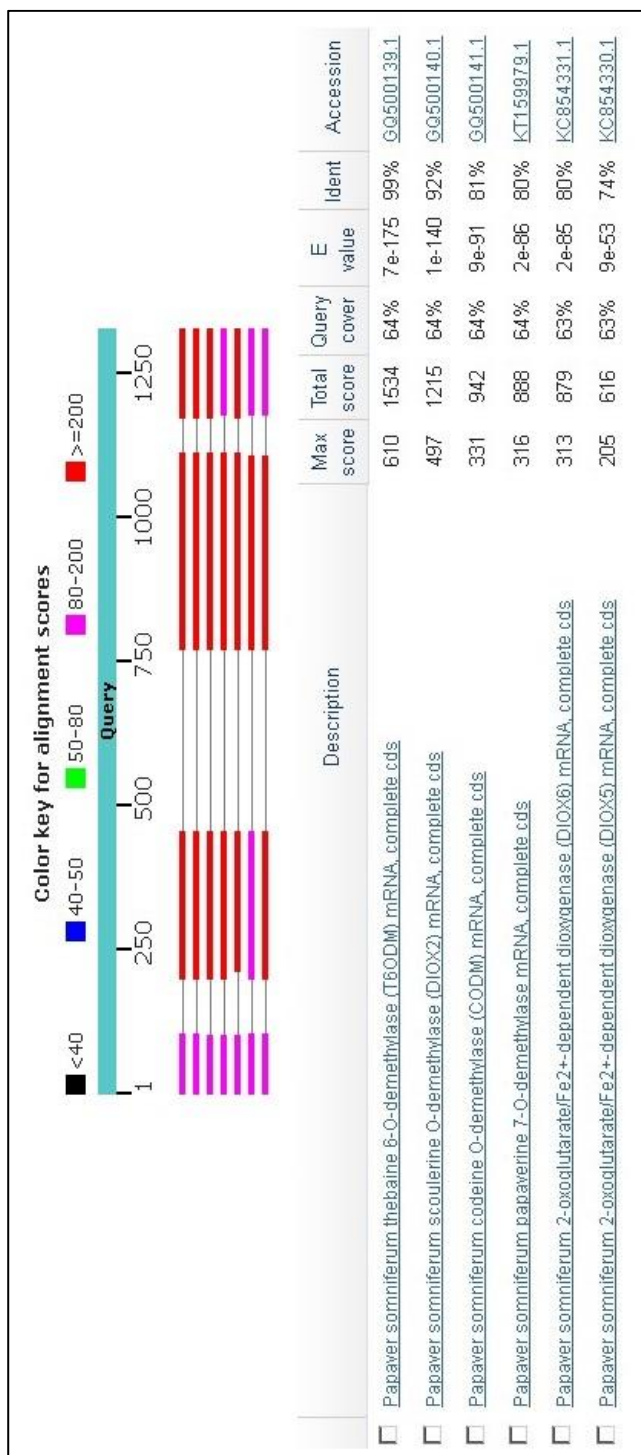
5.2.3 Výsledky sekvenace *T60DM*

Obrázek 11 Porovnání sekvenace genu *T60DM* s referenčním vzorkem v databázi

T60DM_consensus	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TCCGTGCATCGATATAGAAAATTTATTATCTCCAGAACCAATAATCGGAAAGTTAGAAATTAGATAGGCTTCAATTTTGGTTGCAAGAATGGGGTTTTTTTT									
T60DM_consensus	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	CAGGTATATATGTCGTAATAACAAGCATTGTGATTGCATCCAGTAGTTGTACTTTGTTACACTAAATATTAGCAAGTGAATCTTACTTTACATATATATG									
T60DM_consensus	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TTGCAGGTAGTGAAACCATGGAGTCGACGCTTTCATTGGTGGATAGTGTAAATCAGAAATCAAGTTTCTTTAACCTTTCTATGGATGAGAAAATAAAT									
T60DM_consensus	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	ATGAACAGGAAGATGGAGATGTGGAAGGATTTGGACAAGGCTTTATTGAATCAGAGGACCAACACTTGATTTGGGCAGATATATTTATGATGTTCACTCT									
T60DM_consensus	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TCCACTCCATTTAAGGAAGCCTCACTTATTTCAAACCTCCAGTGCCTCAGGTTATTATTAATTCATAATCGGTTTCTATGCACTTGACTTTTTAAT									
T60DM_consensus	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	CTCACATTTTCGTAGTCGGTTTCTGTGCACCTCACTCAGTTTATTCTTATTCCTTTTTTTGGTTGGCCATAACAAAAATTATCCCTCTTGATATTATT									
T60DM_consensus	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TTCTGGTTCCCCATTGACCAATAACATGCAAAATTAACACTCTTTAAAGAGTACGTATGATAGATCATAATTTTTCTCTCTTTGAATTTCTCAG									
T60DM_consensus	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TGATGTGATTGGATACATTAATTTGGTTGGTTTATTATAGTTTTTCATATGATTATCTAATTTACGTACAGGGAGACAATCGAATCTACTCATCAGAAA									
T60DM_consensus	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TGAAAAGTTATCCATGGTTCTCTTTAATAAGATGGAAAAGCTCACAAGTACAAGCAGCCGAGATTAAGGGTATGTCAGAGGTGTTTATAGATGGGAC									
T60DM_consensus	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	ACAAGCAATGAGGATGAATATTATCCCTTGTCTCAACCAATCTCGCCATCGGTCTTACGTGCACTCGGATTTGGCGGTTTGACAATCCTCCTT									
T60DM_consensus	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	CAAAATCAACGAAGTGAAGGATTACAGATAAAAAGAGAGGGGACATGGATTTCACTCAAACCTCTACCTAATCGGTTGCGTAGTGAATGTTGGAGATATTT									
T60DM_consensus	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	TGGAGGTACTGGTCTTGTTCGAATACTGGTTTTCCTGTACCAGAAAATTTCTTATTGTTTTTTCTTTTACAGATAATGACTAATGGAATTTACCAT									
T60DM_consensus	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	AGTGTGATCACCAGGAGTAGTAACTCAACAAATGAGAGGCTCTCAATCGCAACATTTATGACCCCTAGTCTAGAGTCGGTAATAGGCCAATATCAA									
T60DM_consensus	1310	1320								
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl									
	GCTTGATTACTCCAGAGACACCTGC									

Podářilo se osekvovat řadly intronovř sekvence u genu *T6ODM* na zřkladř sekvenovřnř řady amplikonů, nicmřnř dosud nebyly navrřeny vhodnř sekvenační primery, kterř by umořnily jednoduchř a rychlř amplikonovř sekvenovřnř jednoho ři dvou PCR produktů.

Gen *T6ODM* je sekvennřnř nejvřce podobnř scoulerin-O-demetylřze. Sekvenci majř podobnou z 91 %.



Obrřzek 12 Porovnrnř genu *T6ODM* s ostatnřmi geny u mřku setřho

6 Diskuze

Hlavní pozornost z hlediska výzkumu máku setého je především zaměřena na studium biochemických drah souvisejících s různými sekundárními metabolity především morfinové alkaloidy typu morfin, thebain či kodein. Množství obsahových látek je samozřejmě silně ovlivněno podmínkami vnějšího prostředí, ale nemalou roli hraje i množství a typy příslušných enzymů, které řídí tvorbu jednotlivých metabolitů. Z tohoto důvodu převládají genetické studie zaměřené na úroveň exprese konkrétních genů (Unterlinner et al., 1999; Mikus et al., 2008; Chaturvedi et al., 2014), mezi které patří i *CODM*, *COR1* a *T6ODM*, a proto samozřejmě převládají i data v podobě CDS sekvencí. Výjimku tvoří studie publikovaná v roce 2012 uvádějící kompletní sekvence genů kódujících enzymy účastníci se biosyntézy noscapinu (Winzer et al., 2012). Tyto sekvence se však nedaly pro hledání polymorfismu využít, jelikož geny pro noscapin mají pouze některé odrůdy.

Pro detekci polymorfismu u vybraných genů lze předpokládat variabilitu spíše v oblastech intronů než exonů, a proto bylo v prvním kroku nezbytné příslušné introny charakterizovat na sekvenční úrovni. Pro detekci intronových oblastí byl v této práci zvolen přístup kombinující bioinformatickou analýzu sekvenčních dat a praktické testování v laboratoři. Komparativní analýzy řady rostlinných a živočišných druhů ukázaly, že oproti živočichům mají rostliny kratší sekvence intronů a exonů, což platí i o celkové délce genů. Na základě těchto poznatků byly designovány primery takovým způsobem, aby v ideálním případě pokryly větší část známých CDS sekvencí genů. Podobný přístup použil nedávno i tým z Číny (Guo et Liu, 2016) u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Alternativní možností získat požadované sekvence je s pomocí klonování do vhodného (typicky bakteriálního) vektoru nebo aplikace některé z moderních metod tzv. NGS technologie (Celik et al., 2014).

Při designu primerů pro dané geny byla úspěšnost amplifikace kolem 50 %. Daný gen byl rozdělen na 3 až 4 segmenty a navrženy i tzv. překlenovací primery pro vykrytí nedostatků primerů segmentových. Pozorované velikosti ampliconů se většinou shodovaly s očekávanou velikostí. Sekvenace genů proběhla úspěšně s výjimkou genu *T6ODM*, kde se nedařilo osekvenovat druhou polovinu druhého intronu. Pro tuto skutečnost byly navrženy

nové specifické primery, které měly amplifikovat problémový úsek. Bohužel se nedařilo daný segment kvantitativně a kvalitativně amplifikovat. I přes optimalizaci teplotním gradientem se nedařilo daný úsek specificky amplifikovat. Pro navržení nových primerů bylo komplikující i jejich vazebné místo, které mělo široké spektrum specifity. Jednotlivé nové primery byly navíc navzájem velmi homologní. Pokud bychom chtěli daný segment osekvenovat, museli bychom ho ligovat do vhodného vektoru. Pro tuto metodu však není laboratoř katedry genetiky náležitě vybavena a ani nevlastní povolení pro nakládání s GMO.

Tato práce měla za cíl porovnat polymorfismus jednotlivých genů u máku setého. Pokud by se prokázaly vzorce polymorfismu u jednotlivých genotypů, mohla tato skutečnost posloužit jako metodika pro porovnání různých odrůd máku od sebe. Bohužel u genu *CODM* byla prokázána pouze jedna bodová mutace a u ostatních genů byla situace podobná. Tato technika tak nejspíše nebude mezi hlavními pro jednoznačné určení odrůdy máku. Pokud by se ale dalšími studii potvrdila domněnka, že jedna bodová mutace u genu *CODM* je vlastní pouze potravinářským odrůdám máku, mohla by tato mutace sloužit jako marker.

U sekvenace genu *CORI* a studia jeho polymorfismu se nabízí skutečnost využití zmíněných bodových mutací pro rozeznání dvou zemědělských variant máku. Ve studiích a článcích (Ziegler et Facchini, 2008) se sice vyskytuje mák setý (*Papaver somniferum* L.), ale nejpravděpodobněji se jedná o tzv. opiový či farmaceutický mák. Mák pěstovaný v ČR pro potravinářské účely zcela jistě nefiguruje v článcích o genetické identifikaci máku (Lee et al., 2010). S těmito premisami a zjištěními výsledky se dá usuzovat možné rozeznání těchto dvou zemědělských variant máku navzájem od sebe.

Příjemným bonusem při amplifikaci a sekvenaci genu *CORI* bylo zjištění jeho pseudogenu. Tento pseudogen se podařilo samostatně amplifikovat nově navrženými primery a následně ho zcela osekvenovat. Tento objev může přispět k objevení dalších pseudogenů u jiných podobných genů pro syntézu jednotlivých alkaloidů. Evolučně se sekundární metabolity a jejich duplikace nejspíše vyvinuly celkem nedávno (Wink, 2003). Můžeme předpokládat, že objevená duplikace u genu *CORI* se může vyskytovat i u jiných genů. Pro jejich amplifikaci je však nutné navrhnout vhodné primery.

Z hlediska genetiky se získané sekvence morfinových genů délkou nijak výrazně neliší od jiných rostlinných genů (Dodsworth et al., 2015). Velikost tří osekvenovaných genů se pohybovala mezi 1000-1500 bp se třemi introny. Bylo potvrzeno, že proteiny rostlin, mezi které patří i morfinové alkaloidy u máku setého, jsou kódovány mnohem kratšími geny, než u klasických eukaryotních proteinů. Geny kódující rostlinné proteiny mají daleko menší exonové úseky, než třeba geny hub či živočichů (Ramírez-Sánchez et al., 2016).

Dalším problémem byla nejasnost délky daných sekvencí s porovnáním s databázemi. I když v dnešní době existují nové metody sekvenování (Liu et al., 2012), použitá Sangerova metoda při daném množství a poměru cena/výkon zajistila kvalitní a přesné výsledky. Využití NGS metod by však jistě znamenalo redukci času pro sekvenování s možným navýšením počtu sekvenovaných odrůd máku setého.

7 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že zvolené cíle práce byly splněny. Přehledné shrnutí vyplívajících poznatků je uvedeno v následujících bodech.

- Byla uskutečněna bioinformatická analýza sekvenčních dat za pomoci genových databází.
- Bylo navrženo velké množství vhodných primerů pro morfinové geny *CODM*, *COR1* a *T6ODM* s následným provedením optimalizace podmínek pro jejich amplifikaci.
- Byly optimalizovány podmínky pro účely sekvenování.
- Studované geny byly úspěšně osekvenovány a u vybraných odrůd bylo provedeno porovnání sekvencí a vyhodnocena úroveň polymorfismu.
- Hypotéza, že lze identifikovat jednotlivé odrůdy máku za využití sekvenčního polymorfismu genů související s tvorbou morfinových alkaloidů, se částečně potvrdila, jelikož SNP se nejspíše liší u máku potravinářského a opiového. Pro identifikaci klasických odrůd máku však tato metoda vhodná není.
- V rámci této práce byly poprvé charakterizovány sekvence intronů studovaných genů.

8 Bibliografie

8.1 Literární zdroje

- Albrecht, J., Lin, J., Barron, A. 2011. A 265-Base DNA Sequencing Read by Capillary Electrophoresis with No Separation Matrix. *Analytical Chemistry* [online]. 83 (2). 509-515. [cit. 2017-03-22]. ISSN: 0003-2700. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac102188p>>
- Applied Biosystems Standard Dye Sets for Genotyping Applications [online]. 2005. . Applied Biosystems. [cit. 2018-03-28]. Dostupné z: <http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch.php/sequest/foruser/abi_dye_set_card.pdf>
- Ari, Ş., Arikan, M. 2016. Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. Hakeem, Khalid Rehman (ed.), Hüseyin Tombuloğlu (ed.) a Güzin Tombuloğlu (ed.). *Plant Omics: Trends and Applications* [online]. 1. Springer International Publishing. Cham. s. 109-135. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1007/978-3-319-31703-8_5. ISBN: 978-3-319-31701-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-31703-8_5>
- Baertsch, R., Diekhans, M., Kent, W., Haussler, D., Brosius, J. 2008. Retrocopy contributions to the evolution of the human genome. *BMC Genomics* [online]. 9 (1). 466-. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1186/1471-2164-9-466. ISSN: 1471-2164. Dostupné z: <<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-466>>
- Bechyně, M., Kadlec, T., Vašák, J. 2001. Mák. 1. Agrospoj. Praha. Semafor. ISBN: 80-239-4237-9.
- Bigelow, B., Edgar, K. 2006. UXL encyclopedia of drugs & addictive substances. 1. UXL. Detroit. ISBN: 1-4144-0444-1.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* [online]. 10 (1). 421-. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421. ISSN: 1471-2105. Dostupné z: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/10/421>>
- Camilleri, P. 1998. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, Fla.
- Carlson, C., Reider, M., Nickerson, D., Eberle, M., Kruglyak, L. 2005. COMMENT ON 'DISCREPANCIES IN dbSNP CONFIRMATIONS RATES AND ALLELE FREQUENCY DISTRIBUTIONS FROM VARYING GENOTYPING ERROR RATES AND PATTERNS'. *Bioinformatics* [online]. 21 (2). 141-143. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth492. ISSN: 1367-4803. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bth492>>

- Carneiro, M., Russ, C., Ross, M., Gabriel, S., Nusbaum, C., DePristo, M. 2012. Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC Genomics* [online]. 13 (1). 375-. [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.1186/1471-2164-13-375. ISSN: 1471-2164. Dostupné z: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-375>>
- Carrilho, E., Ruiz-Martinez, M., Berka, J., Smirnov, I., Goetzinger, W., Miller, A., Brady, D., Karger, B. 2006. Rapid DNA Sequencing of More Than 1000 Bases per Run by Capillary Electrophoresis Using Replaceable Linear Polyacrylamide Solutions. *Analytical Chemistry* [online]. 68 (19). 3305-3313. [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1021/ac960411r. ISSN: 0003-2700. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac960411r>>
- Di Fiori, N., Squires, A., Bar, D., Gilboa, T., Moustakas, T., Meller, A. 2013. Optoelectronic control of surface charge and translocation dynamics in solid-state nanopores. *Nature Nanotechnology* [online]. 8 (12). 946-951. [cit. 2018-01-28]. DOI: 10.1038/nnano.2013.221. ISSN: 1748-3387. Dostupné z: <<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nnano.2013.221>>
- DNA Sequencing Costs: Data: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) [online]. 2017. Scientific. NIH. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <<https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>>
- Dodsworth, S., Leitch, A., Leitch, I. 2015. Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. 35 (1). 73-78. [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1016/j.gde.2015.10.006. ISSN: 0959437X. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X15001057>>
- Dostál, J. 1950. Květena ČSR a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin, na území Československa planě rostoucích nebo běžně pěstovaných. 1. vyd. Přírodovědecké nakladatelství. Praha. Sběrka příruček Československé botanické společnosti, sv. 2. ISBN: .
- Edgar, R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* [online]. 32 (5). 1792-1797. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1093/nar/gkh340. ISSN: 1362-4962. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh340>>
- Göring, H., Terwilliger, J. 2000. Linkage Analysis in the Presence of Errors II: Marker-Locus Genotyping Errors Modeled with Hypercomplex Recombination Fractions. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 66 (3). 1107-1118. [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.1086/302798. ISSN: 00029297. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707636180>>
- Grothe, T., Lenz, R., Kutchan, T. 2001. Molecular Characterization of the Salutaridinol 7- O -Acetyltransferase Involved in Morphine Biosynthesis in Opium Poppy *Papaver somniferum*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 276 (33). 30717-30723. [cit. 2018-11-24]. ISSN: 0021-9258. Dostupné z: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M102688200>>

- Gurkok, T., Ozhuner, E., Parmaksiz, I., Özcan, S., Turktas, M., İpek, A., Demirtas, I., Okay, S., Unver, T. 2016. Functional Characterization of 4'OMT and 7OMT Genes in BIA Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* [online]. 7. -. [cit. 2018-01-19]. ISSN: 1664-462X. Dostupné z: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00098/abstract>>
- Hall, N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of Experimental Biology* [online]. 210 (9). 1518-1525. [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1242/jeb.001370. ISSN: 0022-0949. Dostupné z: <<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.001370>>
- Hall, T. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT [online]. 1999 (1). 95-98. [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: <<http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>
- Hirata, K. 2004. 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry* [online]. 65 (8). 1039-1046. [cit. 2017-11-23]. ISSN: 00319422. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942204000883>>
- Hjertén, S. 1985. High-performance electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 347. 191-198. [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95485-8. ISSN: 00219673. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301954858>>
- Huang, X., Doneski, L., Wirth, M. 1998. Surface-Confined Living Radical Polymerization for Coatings in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* [online]. 70 (19). 4023-4029. [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.1021/ac980231c. ISSN: 0003-2700. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac980231c>>
- Chan, W., Chang, J. 2014. Pseudogene-Derived Endogenous siRNAs and Their Function. Polisen, Laura (ed.). *Pseudogenes* [online]. 1. Springer New York. New York, NY. s. 227-239. [cit. 2018-03-01]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4939-0835-6_15. ISBN: 978-1-4939-0834-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0835-6_15>
- Chaturvedi, N., Singh, M., Shukla, A., Shasany, A., Shanker, K., Lal, R., Khanuja, S. 2014. Comparative analysis of *Papaver somniferum* genotypes having contrasting latex and alkaloid profiles. *Protoplasma* [online]. 251 (4). 857-867. [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1007/s00709-013-0587-7. ISSN: 0033-183X. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s00709-013-0587-7>>
- Jacq, C., Miller, J., Brownlee, G. 1977. A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell* [online]. 12 (1). 109-120. [cit. 2017-06-22]. DOI: 10.1016/0092-8674(77)90189-1. ISSN: 00928674. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867477901891>>
- Jain, M., Olsen, H., Paten, B., Akeson, M. 2016. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology* [online]. 17 (1). -. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1186/s13059-016-1103-0. ISSN: 1474-

<<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-1103-0>>

- Karger, B., Guttman, A. 2009. DNA sequencing by CE. ELECTROPHORESIS [online]. 30 (1). 196-202. [cit. 2017-03-21]. ISSN: 01730835. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200900218>>
- Kašička, V. 1997. TEORETICKÉ ZÁKLADY A SEPARAČNÍ PRINCIPY KAPILÁRNÍCH ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD: Chem. Listy 91. 320 - 329. Ústav organické chemie a biochemie.
- Kim, Y., Yeung, E. 1997. Separation of DNA sequencing fragments up to 1000 bases by using poly(ethylene oxide)-filled capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A [online]. 781 (1-2). 315-325. [cit. 2017-03-21]. ISSN: 00219673. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196739700472X>>
- Kubánek, V. 2009. Konopí a mák: (pěstování, výroby, legislativa). V Tribunu EU vyd. 2. Tribun EU. Brno. Knihovnicka.cz. ISBN: 978-80-7399-895-0.
- Lee, E., Hwang, I., Kim, N., Lee, K., Han, M., Lee, Y., Kim, M., Yang, M. 2010. An Assessment of the Utility of Universal and Specific Genetic Markers for Opium Poppy Identification. Journal of Forensic Sciences [online]. 55 (5). 1202-1208. [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2010.01423.x. ISSN: 00221198. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1556-4029.2010.01423.x>>
- Li, J., Tang, Z., Hu, R., Fu, Q., Yan, E., Wang, S., Guo, P., Zhao, Q., Yu, D. 2015. Probing surface hydrophobicity of individual protein at single-molecule resolution using solid-state nanopores. Science China Materials [online]. 58 (6). 455-466. [cit. 2018-01-26]. DOI: 10.1007/s40843-015-0057-y. ISSN: 2095-8226. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s40843-015-0057-y>>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology [online]. 2012 (1). 1-11. [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1155/2012/251364. ISSN: 1110-7243. Dostupné z: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364/>>
- Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. 2004. Farmakologie a toxikologie. Vyd. 2. české. Grada. Praha. ISBN: 80-247-0836-1.
- Lynch, M. 2013. The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. Science [online]. 290 (5494). 1151-1155. [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.1126/science.290.5494.1151. ISSN: 00368075. Dostupné z: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5494.1151>>
- Mamedov, T., Pienaar, E., Whitney, S., TerMaat, J., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., Viljoen, H. 2008. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. Computational Biology and Chemistry [online]. 32 (6). 452-457. [cit. 2017-09-21]. ISSN: 14769271. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476927108000881>>

- Maxam, A., Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 74 (2). 560-564. [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1073/pnas.74.2.560. ISSN: 0027-8424. Dostupné z: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.2.560>>
- Metzker, M. 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* [online]. 11 (1). 31-46. [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1038/nrg2626. ISSN: 1471-0056. Dostupné z: <<http://www.nature.com/articles/nrg2626>>
- Mikus, G., Somogyi, A., Bochner, F., Eichelbaum, M. 2008. Thebaine O - demethylation to oripavine: Genetic differences between two rat strains. *Xenobiotica* [online]. 21 (11). 1501-1509. [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.3109/00498259109044400. ISSN: 0049-8254. Dostupné z: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00498259109044400>>
- Padmanabhan, R., Jay, E., Wu, R. 1974. Chemical Synthesis of a Primer and Its Use in the Sequence Analysis of the Lysozyme Gene of Bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 71 (6). 2510-2514. [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1073/pnas.71.6.2510. ISSN: 0027-8424. Dostupné z: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.71.6.2510>>
- Paetkau, D., Strobeck, C. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology* [online]. 4 (4). 519-520. [cit. 2018-01-26]. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00248.x. ISSN: 0962-1083. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00248.x>>
- Pettersson, E., Lundeberg, J., Ahmadian, A. 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomics* [online]. 93 (2). 105-111. [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.10.003. ISSN: 08887543. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754308002498>>
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* [online]. 6 (11). 847-859. [cit. 2018-01-26]. DOI: 10.1038/nrg1707. ISSN: 1471-0056. Dostupné z: <<http://www.nature.com/articles/nrg1707>>
- Prieto-Godino, L., Rytz, R., Bargeton, B., Abuin, L., Arguello, J., Peraro, M., Benton, R. 2016. Olfactory receptor pseudo-pseudogenes. *Nature* [online]. 539 (7627). 93-97. [cit. 2017-08-11]. DOI: 10.1038/nature19824. ISSN: 0028-0836. Dostupné z: <<http://www.nature.com/articles/nature19824>>
- Quigley, W., Dovichi, N. 2004. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Biopolymers. *Analytical Chemistry* [online]. 76 (16). 4645-4658. [cit. 2017-03-22]. ISSN: 0003-2700. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac040100d>>
- Rozen, S., Skaletsky, H. 1999. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. Misener, Stephen a Stephen A. Krawetz. *Bioinformatics Methods and Protocols* [online]. 1. Humana Press. New Jersey. s. 365-386. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1385/1-59259-192-2:365. ISBN: 1-59259-192-2. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1385/1-59259-192-2:365>>

- Ruiz-Martinez, M., Salas-Solano, O., Carrilho, E., Kotler, L., Karger, B. 1998. A Sample Purification Method for Rugged and High-Performance DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Using Replaceable Polymer Solutions. A. Development of the Cleanup Protocol. *Analytical Chemistry* [online]. 70 (8). 1516-1527. [cit. 2017-03-21]. ISSN: 0003-2700. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac971143f>>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 74 (12). 5463-5467. [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463. ISSN: 0027-8424. Dostupné z: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.12.5463>>
- Shokralla, S., SPALL, J., GIBSON, J., HAJIBABAEI, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* [online]. 21 (8). 1794-1805. [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x. ISSN: 09621083. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., Rozen, S. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* [online]. 40 (15). 115-115. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1093/nar/gks596. ISSN: 1362-4962. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gks596>>
- Unterlinner, B., Lenz, R., Kutchan, T. 1999. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *The Plant Journal* [online]. 18 (5). 465-475. [cit. 2017-03-05]. ISSN: 0960-7412. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1999.00470.x>>
- van Baren, M. 2006. Iterative gene prediction and pseudogene removal improves genome annotation. *Genome Research* [online]. 16 (5). 678-685. [cit. 2017-06-22]. DOI: 10.1101/gr.4766206. ISSN: 1088-9051. Dostupné z: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.4766206>>
- Vanin, E. 1985. Processed Pseudogenes: Characteristics and Evolution. *Annual Review of Genetics* [online]. 19 (1). 253-272. [cit. 2017-06-22]. DOI: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001345. ISSN: 0066-4197. Dostupné z: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ge.19.120185.001345>>
- Vašák, J. 2016. Spolek Český modrý mák informuje: ... makový občasník Praha : sborník odborných seminářů "Mák v roce ...". 1. ČZU v Praze. Praha. ISBN: 978-80-213-2443-5.
- Watson, J., Crick, F. 1953. THE STRUCTURE OF DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 18 (0). 123-131. [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1101/SQB.1953.018.01.020. ISSN: 0091-7451. Dostupné z: <<http://symposium.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/SQB.1953.018.01.020>>
- Winzer, T., Gazda, V., He, Z., Kaminski, F., Kern, M., Larson, T., Li, Y., Meade, F., Teodor, R., Vaistij, F., Walker, C., Bowser, T., Graham, I. 2012. A *Papaver somniferum* 10-Gene Cluster for Synthesis of the Anticancer Alkaloid Noscapine.

Science [online]. 336 (6089). 1704-1708. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.1126/science.1220757. ISSN: 0036-8075. Dostupné z: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1220757>>

- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L., Shi, L. 2013. Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. *Cancer Letters* [online]. 340 (2). 284-295. [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.025. ISSN: 03043835. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383512006726>>
- Yamada, Y., Yoshimoto, T., Yoshida, S., Sato, F. 2016. Characterization of the Promoter Region of Biosynthetic Enzyme Genes Involved in Berberine Biosynthesis in *Coptis japonica*. *Frontiers in Plant Science* [online]. 7. -. [cit. 2017-11-20]. ISSN: 1664-462X. Dostupné z: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01352/abstract>>
- Yekkirala, A., Kalyuzhny, A., Portoghese, P. 2009. Standard Opioid Agonists Activate Heteromeric Opioid Receptors. *ACS Chemical Neuroscience* [online]. 1 (2). 146-154. [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1021/cn9000236. ISSN: 1948-7193. Dostupné z: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cn9000236>>
- Zheng, D., Frankish, A., Baertsch, R., Kapranov, P., Reymond, A., Choo, S., Lu, Y., Denoeud, F., Antonarakis, S., Snyder, M., Ruan, Y., Wei, C., Gingeras, T., Guigo, R., Harrow, J., Gerstein, M. 2007. Pseudogenes in the ENCODE regions: Consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Research* [online]. 17 (6). 839-851. [cit. 2017-06-24]. DOI: 10.1101/gr.5586307. ISSN: 1088-9051. Dostupné z: <<http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.5586307>>
- Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y., Yu, J. 2010. The next-generation sequencing technology and application. *Protein & Cell* [online]. 1 (6). 520-536. [cit. 2017-10-12]. ISSN: 1674-800X. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s13238-010-0065-3>>
- Ziegler, J., Diaz-Chávez, M., Kramell, R., Ammer, C., Kutchan, T. 2005. Comparative macroarray analysis of morphine containing *Papaver somniferum* and eight morphine free *Papaver* species identifies an O-methyltransferase involved in benzylisoquinoline biosynthesis. *Planta* [online]. 222 (3). 458-471. [cit. 2017-11-20]. ISSN: 0032-0935. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s00425-005-1550-4>>
- Ziegler, J., Facchini, P. 2008. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 59 (1). 735-769. [cit. 2017-04-19]. ISSN: 1543-5008. Dostupné z: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>>

8.2 Internetové zdroje

<https://www.genome.gov/sequencingcosts/>

<https://www.illumina.com/systems.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

8.3 Seznam tabulek

Tabulka 1 Seznam odrůd máku setého	19
Tabulka 2 Navržené primery pro gen <i>COR1</i>	22
Tabulka 3 Navržené primery pro gen <i>CODM</i>	23
Tabulka 4 Navržené primery pro gen <i>T6ODM</i>	24
Tabulka 5 PCR program Asch9v2	25
Tabulka 6 První teplotní profil.....	27
Tabulka 7 Druhý teplotní profil	27
Tabulka 8 Úspěšnost amplifikace primerů pro <i>CODM</i>	30
Tabulka 9 Úspěšnost amplifikace primerů pro <i>COR1</i>	31
Tabulka 10 Úspěšnost amplifikace primerů pro <i>T6ODM</i>	32

8.4 Seznam obrázků

Obrázek 1 Biosyntéza morfinových alkaloidů.....	7
Obrázek 2 Vývoj ceny sekvenování lidského genomu	13
Obrázek 3 <i>CODM</i> - Varianty primerů: 6-6, 7-7, 8-8, 9-8 a 1-10, 1-11, 12-8, 13-13, 4 genotypy; hm. st. 100bp.....	30
Obrázek 4 <i>COR1</i> - Varianty primerů: 11-9a, 12-10a, 13-13, 14-14, 4 genotypy; DNA mix ladder	31
Obrázek 5 <i>T6ODM</i> - Varianty primerů: 2-2, 3-2, 4-4, 5-5, různé genotypy; hm. st. 100bp	32
Obrázek 6 Porovnání sekvence genu <i>CODM</i> s databází	33
Obrázek 7 Porovnání genu <i>CODM</i> s ostatními geny v máku setém	35
Obrázek 8 Porovnání sekvence genu <i>COR1</i> s a <i>COR1</i> pseudogenem.....	36
Obrázek 9 Výsledky porovnání sekvencí pseudogenů u 10 různých genotypů máku setého.	37
Obrázek 10 Porovnání pseudogenu <i>COR1</i> s ostatními geny u máku setého	40
Obrázek 11 Porovnání sekvence genu <i>T6ODM</i> s referenčním vzorkem v databázi	41
Obrázek 12 Porovnání genu <i>T6ODM</i> s ostatními geny u máku setého	42

Příloha 2: Vícenásobné porovnání genu T6ODM

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
T6ODM_consensus	TCCTGTCATCGATATAGAAAATTTATATCTCCAGAACCATAATCGGAAAGTTAGAAATTAGATAGGCTTCATTTTGCTTGAAGAATGGGGTTTTTT									
GQ500139.1 (T6ODM) mRNA, complT.GC.....C.....CG.G.T.....G...A.....C.....C---									
GQ500141.1 (CODM) mRNA, compleT.GC.....C.....CG.G.T.....G...A.....C.....C---									
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl	A...G...T.GC.G..AG..C.G.A.....C..C..T..G.....C.G..G.....C.C.....C---									
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl	A...T..A..T.GC.G..AG..C.G.A.....C..C..G.....G..G.....C.CG.....C---									
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, compT..G...A...T.....GG...C..A.....G.....C.....C.....C---									
KT159979.1 (7ODM), complete cdT.GC.....C.....GC..T..C.....G..T.....A.T.....C---									
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, complCT.GC.....CA.....G.....CG...T.A.....G.C.....C.....C---									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
T6ODM_consensus	CAGGTATATATGTCGTAATAACAAGCATTGTGATTGCATCCAGTAGTTGTACTTTGTTACACTAAATATTAGCAAGTGAATCTTACTTTACATATATATG									
GQ500139.1 (T6ODM) mRNA, compl									
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple									
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl									
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl									
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp									
KT159979.1 (7ODM), complete cd									
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
T6ODM_consensus	TTGCAGGTAGTGAACCATGGAGTCGACGCTTCATTGGTGGATAGTGTAAAATCAGAAATTCAGGTTCTTTAACCTTTCTATGGATGAGAAAACATAAT									
GQ500139.1 (T6ODM) mRNA, compl	..T.....									
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple	..T..C..G..T.....T.C..A...C.A.A.....A.....C.A..A.....									
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl	..T.....G..A.....TAA..T.....A.G.AA..G.....T..CG.....C..A..CC.A.....AG....									
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl	..T.....C..A.....AA..T.....A.G.AA..G.....T..G.....C..G..AC.A.....AG....									
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp	..T.....G.....TA.....T.....A.CCA.....T.A.....C.A.T..A.....C..G....									
KT159979.1 (7ODM), complete cd	..T..T.G.A.....C..G...A...A...A...G.....G.....C.A.TAG..T..TG....									
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl	..T..T.G.A.....C..G...A...A...A...G.....G.....C.A.TAG..T..TG....									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
T6ODM_consensus	ATGAACAGGAAGATGGAGATG---TGGAAAGTATTGGACAAAGCCTTTATTGAATCAGAGGACCAACACTTGATTGGGCAGATATATTTATGATGTTCCAC									
GQ500139.1 (T6ODM) mRNA, compl									
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple	.C.G...C.....T---T.....CC..A.....G.....G.....A.T..AG.G...GC...A.G									
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl	T.TGG.....A...A---A.....C...G..C.T...A.....A.....G...TAC...C...T									
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl	T.TGG.....A...C.GCC.....C...G..C.T...A.....G.A..G.....G...T.G..CTAC..G									
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp	.G...A.....T.....C...G...C.....C.T.....C.T.....CC...C									
KT159979.1 (7ODM), complete cd	.G...AG.....T.....C...C..T...A.....A.....C.....C..G..T.C.CAA...									
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl	.G...A.....AA.....CA.....T...A.....A.....TT..CGCC.....									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
T6ODM_consensus	TCTTCCACTCCATTTAAGGAAGCCTCACTATTATTTCCAAACTCCCAGTGCCTCAGGTTATTATTAAATTCATAATCGGTTTCTATGCATTGACTTTTT									
GQ500139.1 (T6ODM) mRNA, compl									
GQ500141.1 (CODM) mRNA, compleT.....T..G..C..G.....TC...T.....									
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, complCAAA...A.G.....TAGGCC...C.C.....TC.A.....									
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, complCAAA...A.G.....AGGC...C.C.....TC.A.....									
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, compT.....T.....TC.....									
KT159979.1 (7ODM), complete cdT.....C...C...TC.....									
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, complT.....C...A..C...GT...ACRC.TG..T...TCA.....									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
T6ODM_consensus	AATCTCACATTTTCGTAGTCGGTTCTGTGCACCTCACTCAGTTTATTCATTCTTTTGGTTGGCCATAACAAAAATATCCCTCTTGATATT									
GQ500139.1 (T6ODM) mRNA, compl									
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple									
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl									
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl									
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp									
KT159979.1 (7ODM), complete cd									
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl									

```

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
T60DM_consensus  ATTTTCGGTTCGCCCATTTGACCAATAAACATGCAAAATTAACACTCTTTAAAGAGTACGTATGATAGATCATAATATTTTCTCTTTGAAATTTCT
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
T60DM_consensus  CAGTGATGTGATTGGATACATTAATTTGGTTGGTTTATTATAGTTTTTTCATATGATTATCTAATTTACGTACAGGGAGACAACTCGAATCCTACTCATCAG
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
T60DM_consensus  AAATGAAAAGTTTCCATGGTTCCTTTTAAAGATGGAAAAGCTCTACAAGTACAAGCCAGCCGAGATTAAGGG---TATGTCAGAGGTGTTTATAGA
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
T60DM_consensus  TGGGACACAGCAATGAGGATGAACATTTATCCCCCTTGCTCAACCAATCTCGCCATCGGTCTTACGTGCGCACTCGGATTTGGCGGTTTGACAATC
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
T60DM_consensus  CTCCTTCAAACTCAACGAAGTGAAGGATTACAGATAAAAAGAGAGGGGACATGGATTTCAGTCAACCTCTACCTAATGGCGTTCGTAGTGAATGTTGGAG
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
T60DM_consensus  ATATTTGGAGGTACTGGTCCTTGTTCGAATACTGGTTTTGCCTGTACCAGAAAATTTCTTATTGTTTTTCTTTACAGATAATGACTAATGGAAT
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280     1290     1300
T60DM_consensus  TACCATAGTGTGATCACCAGGAGTAACTCAACAAATGAGAGGCTCTCAATCGCAACATTTTCATGACCCCTAGTCTAGAGTCGGTAATAGGCCCAA
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

1310     1320     1330
T60DM_consensus  TATCAAGCTTGATTACTCCAGAGACACCTGC
GQ500139.1 (T60DM) mRNA, compl
GQ500141.1 (CODM) mRNA, comple
KC854329.1 (DIOX4) mRNA, compl
KC854330.1 (DIOX5) mRNA, compl
GQ500140.1 (DIOX2) mRNA, comp
KT159979.1 (70DM), complete cd
KC854331.1 (DIOX6) mRNA, compl

```