

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Optimalizace detekce klíčových genů biosyntetických drah
alkaloidů u máku

Autor diplomové práce: Bc. Sára Součková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Irena Hoštičková

Konzultant z univerzity: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Sára SOUČKOVÁ**
Osobní číslo: **Z17078**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Optimalizace detekce klíčových genů biosyntetických drah alkaloidů u máku**
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem diplomové práce je návrh primerů a optimalizace detekce vybraných klíčových genů biosyntetické dráhy alkaloidů u máku setého. Práce bude rozdělena na dvě části skládající se z literárního přehledu a experimentální části s praktickým využitím výsledků.

- 1) **Úvod** - stručný nástin molekulárních technik a využití molekulárních markerů jako selekčních nástrojů ve šlechtění rostlin.
- 2) **Literární přehled** - metody DNA fingerprintingu, typy molekulárních markerů, základní aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin.
- 3) **Cíl práce** - definice hypotéz a cílů práce.
- 4) **Materiál a metody** - popis a charakterizace analyzovaných genotypů, izolace DNA, bioinformatická analýza dostupných sekvencí, návrh primerů a optimalizace PCR detekce.
- 5) **Výsledky** - vyhodnocení profilů výsledků PCR analýz, vyhodnocení elektroforetických a sekvenčních dat, vyhodnocení stability DNA profilů, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.
- 6) **Diskuze** - porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.
- 7) **Závěr** - přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.
- 8) **Seznam použité literatury** - v abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).
- 9) **Obsah** - uvedení jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Gustavo Caetano-Anollés, Pater M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley and Sons, Inc., New York

Avis J.C. (2004): Molecular Markers, Natural History, and Evolution. - Sinauer Associates, London

Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. - CRC Press, Boca Raton, USA

Koh H.J. et al. (2015): Current Technologies in Plant Molecular Breeding. Springer, New York

Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts

Vedoucí diplomové práce: Ing. Irena Jelínková

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 28. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2019



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

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



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

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

Prohlášení autora diplomové práce

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum

.....

Bc. Sára Součková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Ireně Hoštičkové za odborné vedení práce, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala v průběhu zpracování této práce.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá vytvořením schéma biosyntetické dráhy vybraných alkaloidů máku setého, návrhem primerů pro vybrané geny a optimalizací PCR reakce těchto genů pro amplifikaci a následné sekvenování co nejdelších fragmentů. Optimalizace PCR reakce byla provedena pro geny *7OMT*, *TNMT* a *CODM*, které se podílejí na biosyntetické dráze morfinu, kodeinu, papaverinu, noscapinu a sanguinarinu. Každý gen byl rozdělen na polovinu a primery byly navrženy samostatně pro každou polovinu genu. Celkem bylo navrženo 13 párů primerů. Optimalizováno bylo pět párů primerů pomocí gradientové PCR a gelové elektroforézy. Tyto primery byly použity pro sekvenační analýzu.

Klíčová slova: mák setý, biosyntetická dráhy, alkaloidy, primery, PCR

Abstract

The thesis deals with the creation of the biosynthetic pathways of selected alkaloids of opium poppy. Then is following the design primers for selected genes and optimization of PCR reaction of these genes for amplification and sequencing of the longest fragments. The PCR reaction was optimized for the *7OMT*, *TNMT* and *CODM* genes. These genes are involved in biosynthetic pathways of morphine, codeine, papaverine, noscapine and sanguinarine. Each gene was split in half. The primers were designed separately for each half of the gene. Altogether were designed 13 pairs primers. 5 pairs primers were optimized by gradient PCR and gel electrophoresis. These primers were used for sequencing analysis.

Klíčová slova: opium poppy, biosynthetic pathway, alkaloids, primers, PCR

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled	10
2.1 Mák setý	10
2.1.1 Historie.....	10
2.1.2 Biologie máku	11
2.1.3 Morfologie máku.....	13
2.1.4 Pěstování máku	14
2.2 Opium.....	17
2.2.1 Alkaloidy.....	18
2.2.2 Biosyntetická dráha alkaloidů.....	21
2.3 Základní aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin	24
2.3.1 Molekulární markery.....	24
3. Cíl práce.....	27
4. Materiál a metodika	28
Odrůda Onyx	28
Odrůda Orel	28
4.1 Návrh primerů	28
4.2 Izolace DNA.....	29
4.3 Polymerázová řetězová reakce	30
4.4 Elektroforéza	30
4.5 Sekvenování	31
5. Výsledky	32
5.1 Primery	32
5.2 Gradientová PCR a sekvenování.....	35
5.2.1 Optimalizace primerů pro sekvenování genu <i>7OMT</i>	35

5.2.2	Optimalizace primerů pro sekvenování genu <i>TNMT</i>	41
5.2.3	Optimalizace primerů pro sekvenování genu <i>CODM</i>	43
6.	Diskuze	47
7.	Závěr	49
8.	Seznam použité literatury a zdrojů	50
9.	Seznam použitých zkratk	55
10.	Seznam tabulek, obrázků	57

1. Úvod

Pěstování máku v České republice má dlouholetou tradici. Rostlina je zajímavá produkcí oleje a semen. Tyto komodity mají své využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Obecně známé jsou také vývary z makovic s pozitivními účinky na lidský organismus. Mák patří v Čechách mezi nejvýznamnější olejniny.

Produkce máku je v České republice omezena legislativou. Je dovoleno zde pěstovat mák s maximálním obsahem morfinu 0,8 %. Česká republika je nejvýznamnějším pěstitelem tohoto typu máku. V některých státech je pěstování opiového máku legální například v Maďarsku, Francii, Indii či Španělsku. V některých zemích však dochází k velkoobjemové produkci opiového máku za účelem ilegální distribuce návykových látek. Tyto zdroje máku jsou určeny především pro výrobu heroinu. Touto výrobou je nechvalně znám především Afghánistán a oblast Myanmar.

Odrůdy máku můžeme dělit do dvou skupin dle množství opia obsaženého v makovici. Toto rozdělení předurčuje i jejich využití. Odrůdy s nižší produkcí opia se využívají pouze v potravinářském průmyslu. Odrůdy s vyšším obsahem se využívají v potravinářském i ve farmaceutickém průmyslu.

Alkaloidy tvořící jednu ze složek opia se získávají z makovic bez semen. Nejdůležitější alkaloidy máku setého jsou morfin, kodein, tebain, papaverin, sanguinarin, noskapiin a berberin. Jejich biosyntetická dráha je složitá a zahrnuje mnoho enzymových katalyzátorů i meziproduktů. Dráha je dlouhá, a tedy i energeticky náročná. Díky znalostem celé biosyntetické dráhy je možné zjistit jaké geny jsou v této dráze zapojeny.

2. Literární přehled

2.1 Mák setý

Mák setý neboli snodárný či spánkový (*Papaver somniferum* L.) pochází z východoasijského (Čína, Nepál) a předoasijského (Malá Asie, Zakavkazí, Írán, vysočiny Turkménie) genového centra (Vašák *et al.*, 2010).

Český rodový název mák souvisí s původně asi řeckým *mékón* (mák). Druhový latinský název (*somnifer* = snodárný; pochází ze *somnus* = spánek, *ferre* = přinést) vyjadřuje uspávací účinek mléčné šťávy (Novák, 2007).

Patří do čeledi mákovitých (*Papaveraceae*) a do rodu *Papaver* (mák), který dále obsahuje asi 120 druhů (Baranyk *et al.*, 2010).

Říše	<i>Plantae</i>
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>
Třída	<i>Rosopsida</i>
Řád	<i>Ranunculales</i>
Čeleď	<i>Papaveraceae</i>
Podčeď	<i>Papaveroideae</i>
Rod	<i>Papaver</i>
Druh	<i>Papaver somniferum</i> L.

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení máku setého (Labanca *et al.*, 2018).

2.1.1 Historie

Původ kulturního máku setého není spolehlivě znám, jako planě rostoucí nebyl zjištěn. Za jeho předka bývá obvykle považováno mák štětinkatý (Novák, 2007).

Doložené nálezy máku pochází z neolitu, mladší doby kamenné, hlavně v kolových stavbách předhůří Alp. Jsou datovány asi 2 tisíce let př. n. l. Nejstarší nález máku z České republiky pochází z Ostrova u Stříbra se stářím asi 2 800 let.

Mák pěstovali 4 tisíce let př. n. l. Summerové. Z té doby též pochází zmínka o používání šťávy z makovic. Staří Egypťané v XVIII. dynastii (asi 1 550-1 300 př. n. l.) měli nádoby ve tvaru makovic. V Turecku je mák tradiční rostlinou již od 3 000 let př. n. l.

Mák se v Evropě nejen jako ozdoba předmětů a peněz zmiňuje už 1 000 až 2 500 př. n. l. V 9. století Homér v *Ilyas* a *Odyssea* básní o Helenině trojské směsi. Ta zřejmě pro obsah opia tlumila bolesti i sváry. Antické Řecko je všeobecně z pohledu máku – asi z doby 600 let př. n. l. – velmi poetické. Makovice jsou zde symbolem boha spánku Hypnose a jeho bratra Thanata – boha smrti. Jejich matkou je bohyně noci Nyx zobrazovaná s černými křídly. V jedné ruce drží bílé dítě Hypnose a v druhé černého Thanata. Synem Hypnose je bůh snů Morfeus, který bývá zobrazován ověnčený makovicemi. Mák podle legendy lidem darovala bohyně Demeter. Současné řecké město Sikion se v 8. století př. n. l. nazývalo Makon (město máku). Odtud je i staré synonymum pro opium a to „mekonium“ s proti bolestivými účinky. Toto zmiňuje již v roce 460 př. n. l. Hippokrates. Způsob nařezávání makovic popsal na konci 4. století Theofrast. Lékař Herakmet ve 3. století př.n.l. určil dávky opia podle nemocí.

V Evropě se mák jako zahradní a okrasná plodina pěstuje od středověku. Obecně jsou známi jeho narkotické účinky, proto jsou odrůdy s obsahem návykových látek regulovány. V zahradách takto vytrval v poměrně velkém rozsahu asi až do roku 1990. Od počátku 21. století je jeho zahradní pěstování výjimkou (Vašák *et al.*, 2010).

2.1.2 Biologie máku

Popsaných druhů máku setého je více než 100. Tento rod se začal od první poloviny 19. století postupně členit do nižších kategorií tzv. sekcí. Jsou přitom využívány hlavně morfologické diakritické znaky druhů, areály jejich rozšíření a od konce 20. století, a také složení jejich alkaloidních spekter. Máky obsahují alkaloidy několika typů. Alkaloidní produkce je konstantním, geneticky fixovaným znakem (Vašák *et al.*, 2010).

Sekce *Papaver* obsahuje pouze dva jednoleté druhy – mák setý (*Papaver somniferum* L.) a mák štětinatý (*Papaver setigerum* DC.). Rostou planě v jižní Evropě, Mediteránu a Malé Asii. Rostliny obou těchto druhů mají nejčastěji květy světlé či sytě fialové. U řady genových zdrojů jsou však květy bílé, červené a růžové zpravidla s temnou, řidčeji bílou, skvrnou na bázi. Tobolky jsou různých tvarů, zuby terče jsou zřetelně oddálené. Základní chromozomové číslo sekce je $n = 11$, v rámci rodu je výjimečné. Rostliny jsou diploidní ($2n = 22$), velmi zřídka tetraploidní ($2n = 44$).

Pro rostliny této sekce je charakteristická a společensky významná přítomnost alkaloidů.



Obr. č. 1: Mák setý (<https://www.alamy.com>)

Rostlinu máku setého je možné využít jak pro produkci semen, která jsou určena pro lidskou výživu, tak i makovou slámu – makovinu pro farmaceutický průmysl.

Zemědělsky nejvýznamnější je členění máku na mák opiový, semenný či olejný. Mák opiový má sedm poddruhů, které spojuje produkce bílého latexu vytékajícího z makovic, tj. opia (Vašák *et al.*, 2010). Tento mák má velmi dobře vyvinutý systém cévních svazků, v jejichž floémové části se nacházejí mléčnice s vysokým obsahem alkaloidů v latexu (Baranyk *et al.*, 2010). Makovice jsou hladké. V opiové zralosti, když zelené makovice po naříznutí intenzivně mléčí, mají tobolku pokrytou voskovými výpotky. Mák semenný má jen jeden poddruh. Makovice jsou hrbolaté a lýko je méně vytvořené, tvrdé, s malými mléčnicemi, které téměř nemléčí (Vašák *et al.*, 2010), zato poskytují vyšší výnos kvalitních semen (Baranyk *et al.*, 2010). Využití semene je tradičně kulinární a v potravinářském průmyslu (Vašák *et al.*, 2010). Makovinu (prázdné tobolky) a horní část stonku anebo její drť nakupuje farmaceutický průmysl pro získání alkaloidů na výrobu léčiv. Makovina jediným přírodním zdrojem morfinu a dalších alkaloidů pro medicínské účely (Yazici *et Yilmaz*, 2017).

2.1.3 Morfologie máku

Semeno máku je ledvinovité, dlouhé asi 1,0–1,5 mm. Jeho povrch je rozbrázděný v šestiúhelníkové plošky ohraničené mírně vystouplými žebry. Tento zdrsňený povrch proto zvyšuje přilnavost práškovitých ochranných prostředků i vody. Naše odrůdy mají modré, šedomodré, bílé, případně okrové osemení. Barva však může být také stříbrošedá, fialová, růžová, hnědá až černá. Blankytně modrá barva osemení je určitou garancí typické makové chuti.

Kořenová soustava je tvořena křulovým kořenem s několika silnými postranními kořeny. Tyto hlavní prvky jsou doplněny velkým množstvím vláscitých kořínků, které se tvoří mělce pod povrchem půdy.

Lodyha máku dorůstá do výšky 1-1,8 m. Počet větví je odrůdovým znakem, který je ale velmi silně ovlivněn sponem, v němž rostliny pěstujeme. Lodyha pod makovicí může být hladká nebo případně zcela pokryta štětinkami – ostny. U nás pěstované odrůdy se v tomto znaku štěpí.

Listy se dělí na spodní (pod rozvětvením rostliny), střední (v jejichž úžlabí se tvoří větve) a horní (přisedlé k jednotlivým větvím). Listy jsou jednoduché, podlouhlé, mírně zvlněné a zubovité. Jsou pokryty jemnou voskovou vrstvičkou.

Květ máku má dva kališní lístky a čtyři korunní plátky. Korunní plátky mohou být různě zbarvené, ve většině případů se na bázi objevuje velká skvrna. Květy mohou být růžové, světle nebo tmavě červená, fialové. Korunní plátky jsou buď celokrajné nebo zubaté, někdy i silně roztrěpené. Tyčinek je mnoho (150–250). Také pylu se tvoří velké množství. Pylová zrna jsou životná přibližně týden. Mák se řadí mezi samosprašné rostliny.

Tobolka máku (makovice) může být zcela uzavřená nebo má pod paprsky blizny otvory, kterými se může semeno vysypat na zem. Velikost a tvar tobolek jsou především odrůdovým znakem. Množství a velikost semen závisí na velikosti tobolky, jejím tvaru a početu lamel v tobolkách. Semena přisedají na poetu, který se shoduje s počtem paprsků blizny. Toto je vidět na korunce makovice, jež je současně bliznou. Tvar makovic může být oválný, kulovitý, kuželovitý nebo zploštělý. Tvar bliznového terče je buď střečovitý, talířovitý nebo miskovitý. Počet lamel v makovici

se pohybuje v rozmezí 8–14. V tobolkách může být až 12 000 semen. Obvyklý počet je kolem 4-6 000 a hmotnost semen 2-3 g na makovici (Vašák *et al.*, 2010).

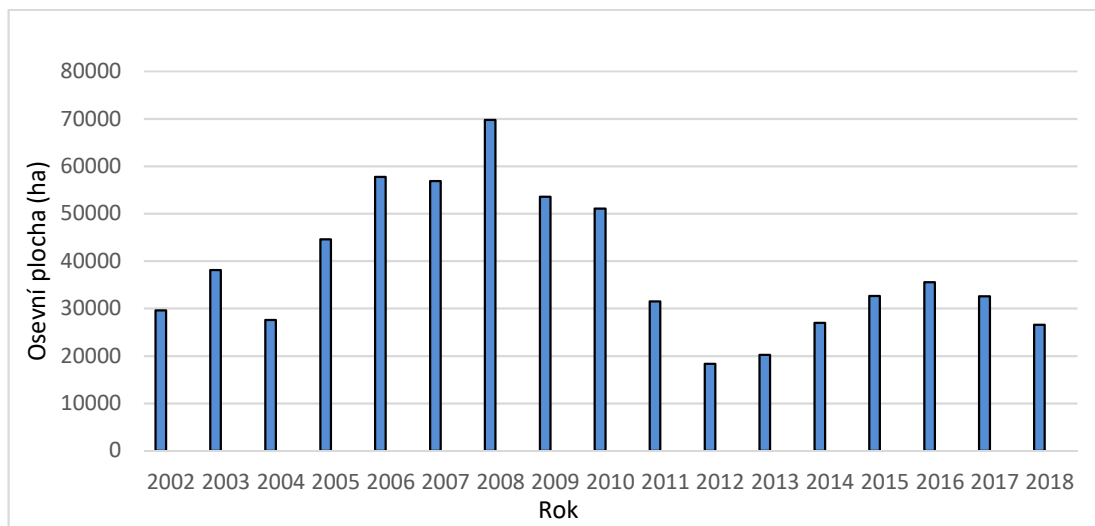


Obr. č. 2: Mák setý (<http://botanika.wendys.cz>)

2.1.4 Pěstování máku

Mák má v České republice dlouhodobou pěstitelskou a spotřebitelskou tradici (Baranyk *et al.*, 2010). Historicky byl mák pěstován a využíván jako olejnina, potravina. Okrajově se uplatnily v lidovém léčitelství výluhy a tinktury z tobolek jako analgetikum a hypnotikum. Nebyly nalezeny žádné záznamy, že by v České republice docházelo ke zneužívání této kulturní plodiny. Odrůdy pěstované na našem území jsou máky olejně a jsou tedy orientované na produkci kulinárně hodnotného olejnatého semene, a proto mají nižší obsah alkaloidů, než odrůdy specializované pro farmaceutické zpracování (Agris, 2019). Jeho pěstování je dáno legislativou. Zákon č. 273/2013, kterým se mění zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách, zakazuje pěstování odrůd máku setého (*Papaver somniferum* L.), které mohou v sušině z tobolek obsahovat více než 0,8 % morfinu (Ministerstvo zdravotnictví, 2019). V České republice se alkaloidy získávají zpracováním prázdných suchých makovic (Novák, 2007). Dále je také ohlašovací povinnost pěstování máku při celkové ploše větší než 100 m² a ohlašovací povinnost při vývozu a dovozu makoviny (Ministerstvo zdravotnictví, 2019).

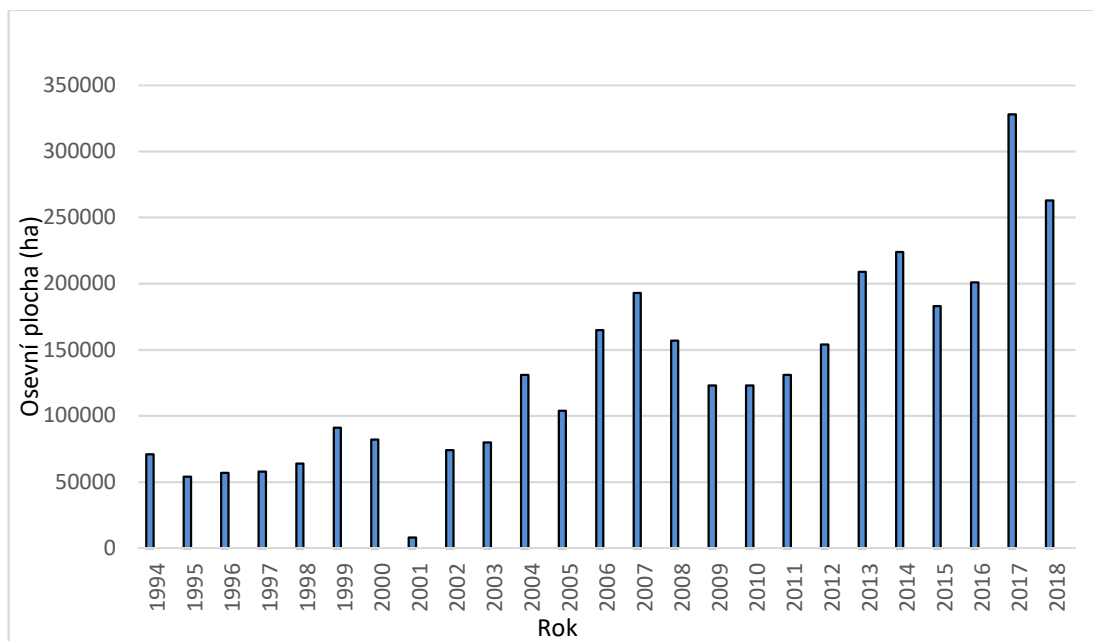
Česká republika je nejvýznamnějším světovým pěstitelem a exportérem konzumního máku. V roce 2012 došlo v české republice k poklesu osevni plocha máku setého pod úroveň 50 % dřívějších průměrných hodnot. Od roku 2013 byla plocha postupně navyšována. V posledních dvou letech však pěstování této plodiny komplikují nepříznivé vnější podmínky (EAGRI¹, 2018).



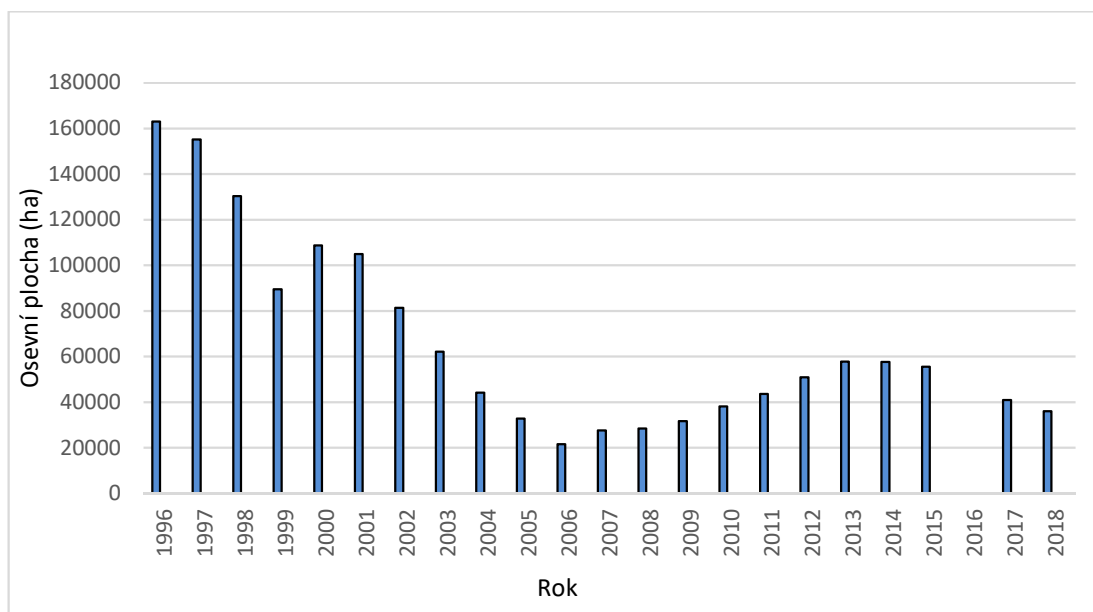
Graf č. 1: Osevni plocha máku setého v ČR v letech 2002–2018 (Český statistický úřad, 2019).

V České republice je produkce opiového máku zakázaná, ale jsou státy, ve kterých se opiový mák pěstuje legálně např. v Turecku, Indii, Austrálii, Španělsku, Francii, Maďarsku (Yazici *et* Yilmaz, 2017) a ve Velké Británii (Agris, 2019).

Jsou ale i státy ve kterých produkce probíhá ilegálně. Největším ilegálním producentem opia je Afghánistán. V roce 2017 zde byla osevni plocha 328 000 ha, které odpovídají 3/4 celkové odhadované plochy ilegální produkce opia. V roce 2018 produkce klesla na 263 000 ha, došlo tedy ke snížení pěstitelské plochy o 20 % (UNODC¹, 2018). Druhým největším producentem byl Myanmar s 41 000 ha v roce 2017, v roce 2018 osevni plocha klesla o 12 % na 36 100 ha (UNODC³, 2018).



Graf č. 2: Osevní plocha máku setého v Afghánistánu v letech 1994–2018 (UNODC², 2018).



Graf č. 3: Osevní plocha máku setého v Myanmaru v letech 1996–2018 (UNODC³, 2018).

Hlavní problémem při snaze omezit pěstování opiového máku jsou životní podmínky v produkčních oblastech. V Indii, Pákistánu, Afghánistánu a tzv. zlatém trojúhelníku na území Myanmaru, Thajska a Laosu vynáší chudým farmářům produkce opiového máku vyšší výdělky, než kterých by dosáhli pěstovaných jiných plodin. Nelegální produkci opia se proto přes veškerou snahu nepodařilo potlačit a problémy s nezákonnou distribucí nejen opia, ale hlavně opiových derivátů (heroin) přetrvávají (Baranyk *et al.*, 2010).

2.2 Opium

Rostlina je ve floémové části prostoupena dlouhými trubicovými mléčnicemi, které vznikly postupným rozpouštěním buněčných přehrádek a splynutím těchto buněk (Baranyk *et al.*, 2010). Celá rostlina (kromě semen) obsahuje mléčnou šťávu (latex), na vzduchu tuhnoucí v hnědou hmotu zvanou opium (Novák, 2007).

Opium se získává mělkým nařezáváním zelených tobolek zhruba 15–20 dnů po odpadu květů (Vašák *et al.*, 2010). Nařezávání se provádí v podvečer speciálními noži s paralelně uloženými ostřími tak, aby se stěna makovice neprořízla. Ráno druhý den se z povrchu tobolek seškrabávají krůpěje zaschlého latexu (opia). Ty mají hnědou až temně hnědou barvu, hořkou chuť a omamnou vůni (Vašák *et al.*, 2010). Pokud není sklizeň provedena ve správný čas (v době kvetení) je ovlivněna kvalita latexu. Pokud je sklizeň příliš časná, sníží se obsah morfinu. V případě, kdy je mák sklizen příliš pozdě, morfin postupně degraduje na kodein (Labanca *et al.*, 2018).



Obr. č. 3: Čerstvě naříznutá makovice s latexem (<https://pflanzenforschung.de>)



Obr. č. 4: Makovice s uschlým latexem (<http://handmaid.cf>)

Opium obsahuje látky typické pro mléčné šťávy, tj. bílkoviny, sliz, pryskyřice, vosky a enzymy. Dále obsahuje organické kyseliny (např. kyselinu mléčnou, mekonovou, opiánovou) a lakton mekonin (Vašák *et al.*, 2010). Nejznámější složkou opia jsou alkaloidy (Novák, 2007).

Opium se řadí mezi silné jedy (Vašák *et al.*, 2010). Zneužívání jeho složek, zejména alkaloidů a jejich derivátů vede k chorobnému návyku tzv. morfinismu (Novák, 2007).

2.2.1 Alkaloidy

Alkaloidy rodu *Papaveraceae* se řadí do skupiny isochinolinových alkaloidů (Evans *et al.*, 2009). Tato skupina se dále dělí na různé typy:

- tetrahydroisochinolinové
- benzyloisochinolinové – papaverin
- ftalidisochinolinové – noskapin
- protoberberinové – berberin
- protopinové
- aporfinové
- morfinanové – kodein, morfin, tebain
- benzofenanthridinové – sanguinarin
- emetinové (Spilková *et al.*, 2016).

Jsou jednou z hlavních skupin dusíkatých sekundárních metabolitů rostlin. Jejich význam pro rostlinu není jednoznačný. Předpokládá se, že vznikly v důsledku

obranného mechanismu rostliny. V opačném případě mohou být jen odpadními látkami rostlinného původu (Vašák *et al.*, 2010).

Alkaloidy se vyskytují v cytoplazmě specializovaných buněk – laticifery, které jsou spojeny s floémem ve všech orgánech (Desgagné-Penix *et al.*, 2010). Floém je vodivá tkáň lymfy a je tvořena síťovými prvky, které mohou být rozlišeny v síťových buňkách a síťových trubicích. Parenchymatické buňky obklopují laticifery v rámci velkého a malého cévního svazku (Labanca *et al.*, 2018).

Alkaloidy se syntetizují v rostlinách již 2-3 dny po vyklíčení. Postupně se syntetizují v kořeni, hypokotylu, dělohách, pravých listech, a nakonec ve stonku a tobolce. V období nejintenzivnějšího růstu, to znamená od fáze listové růžice až do fáze začátku stonkování jsou alkaloidy soustředěny v kořenech. V listech a lodyhách je nejvyšší obsah v období intenzivního růstu rostliny do fáze kvetení až 14 dní po odkvětu. V tobolkách se nejvyšší obsah opia vyskytuje v období opiové zralosti (Vašák *et al.*, 2010).

V máku bylo identifikováno více než 40 alkaloidů. Celkový obsah alkaloidů dosahuje až 25 % opia (Spilková *et al.*, 2016). 6 alkaloidů tvoří většinu obsahu, jsou to morfin (4–21 %), tebain (0,5–2 %), kodein (0,8–2,5 %), noskapiin (4–8 %), papaverin (0,5–2,5 %) a retikulin (0,1–2 %) (Abedini *et al.*, 2018).

Papaver somniferum se ukázal jako modelový druh ke studiu metabolismu alkaloidů, protože tato rostlina hromadí velké množství jejich podskupin (Scrossa *et al.*, 2018).

Chirální centra v alkaloidové kostře vylučují chemickou syntézu jako alternativu k pěstování plodin pro komerční produkci farmaceutických opiátů (Onoyovwe *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu zůstává hlavním zdrojem mák setý (Jablonická *et al.*, 2018). Např. morfin obsahuje 5 chirálních center. Morfin vyskytující se přirozeně má analgetické účinky, zatímco uměle syntetizovaný morfin žádné analgetické účinky nemá (Brook *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Morfinanové alkaloidy

Morfin byl poprvé izolován v roce 1804 Fridrichem Setürnerem. Komerční výroba morfia začala v roce 1820 v Evropě a v roce 1830 ve Spojených státech

(Brook *et al.*, 2017). Po vynálezu podkožní injekce v roce 1853 se morfin v hojné míře používal k tišení bolesti v americké občanské válce a také v prusko-rakouské válce. V roce 1874 poprvé připravil Alder Wright analog morfinu – diacetylmorfin. Byl pojmenován heroin a používal se především proti kašli. Jeho návykovost byla zjištěna až mnohem později. Heroin na rozdíl od morfinu má méně vedlejších účinků, proto získal celosvětovou popularitu (Baranyk *et al.*, 2010). V současné době je morfin jedním z nejznámějších příkladů používání léků rostlinného původu (Brook *et al.*, 2017). Tento alkaloid má silné analgetické účinky, které jsou důležité v oblasti medicíny. Na druhou stranu má závažné vedlejší účinky, např. závislost, akutní otrava, nebo smrt (Du *et al.*, 2018).

Kodein je méně účinný než morfin, ale také méně návykový. Používá se jako antitusikum a při léčbě těžkého průjmu (Mishra *et al.*, 2013). Kodein v roce 1832 objevil Pierre-Jean Robiquet (Wisniak, 2013).

Tebain je výchozím materiálem pro výrobu polosyntetických opiátů, např. oxykodonu, oxymorfonu a buprenorfinu. Dále je prekurzorem morfinu a kodeinu (Hagel *et Facchini*, 2013).

2.2.1.2 Benzylochinolinové alkaloidy

Papaverin je jeden z hlavních alkaloidů v máku. Byl používán jako lék pro léčbu křečí střevních a močových cest, astma, renální a biliární koliky, plicní arteriální embolii, migrény, schizofrenii a jako relaxační látka hladkého svalstva (Desgagné-Penix *et Facchini*, 2012). Tyto účinky jsou způsobeny zvýšením hladiny cAMP inhibicí fosfodiesteráz (Pathak *et al.*, 2013). Papaverin byl objeven v roce 1848 Georgem Merckem (Han *et al.*, 2010).

Papaverin byl prvním opiovým alkaloidem, pro který byla navržena biosyntetická dráha. Dráha papaverinu má dvě možné cesty. První je NH cesta, která vede přes meziprodukt (S)-norretikulín a druhá NCH₃ cesta, která vede přes (S)-retikulín. První zmiňovaná dráha byla identifikována jako hlavní metabolická cesta k papaverinu (Desgagné-Penix *et Facchini*, 2012).

2.2.1.3 Ftalidisochinolinové alkaloidy

Noskapiin byl objeven v roce 1803 francouzským průmyslovým chemikem Charlesem Derosem (Dang *et Facchini*, 2014). Je používán jako lék proti kašli.

Noskapiin na rozdíl od jiných opiátů není návykový. Po morfinu je to druhý nejbohatší alkaloid v latexu. Vzhledem k výskytu dvou chirálních center v této molekule je jeho de novo chemická syntéza těž vyloučena (Abedini *et al.*, 2018).

2.2.1.4 Benzofenanthridinové alkaloidy

Sanguinarin vykazuje specifické toxické účinky proti býložravcům a mikrobiálním patogenům (Alcantara *et al.*, 2005). Sanguinarin se nevyskytuje v latexu, ale dochází k jeho akumulaci v kořenech (Beaudoin *et Facchini*, 2014).

2.2.1.5 Protoberberinové alkaloidy

Berberin snižuje hladinu cholesterolu a funguje jako svalový relaxant (Labanca *et al.*, 2018).

2.2.2 Biosyntetická dráha alkaloidů

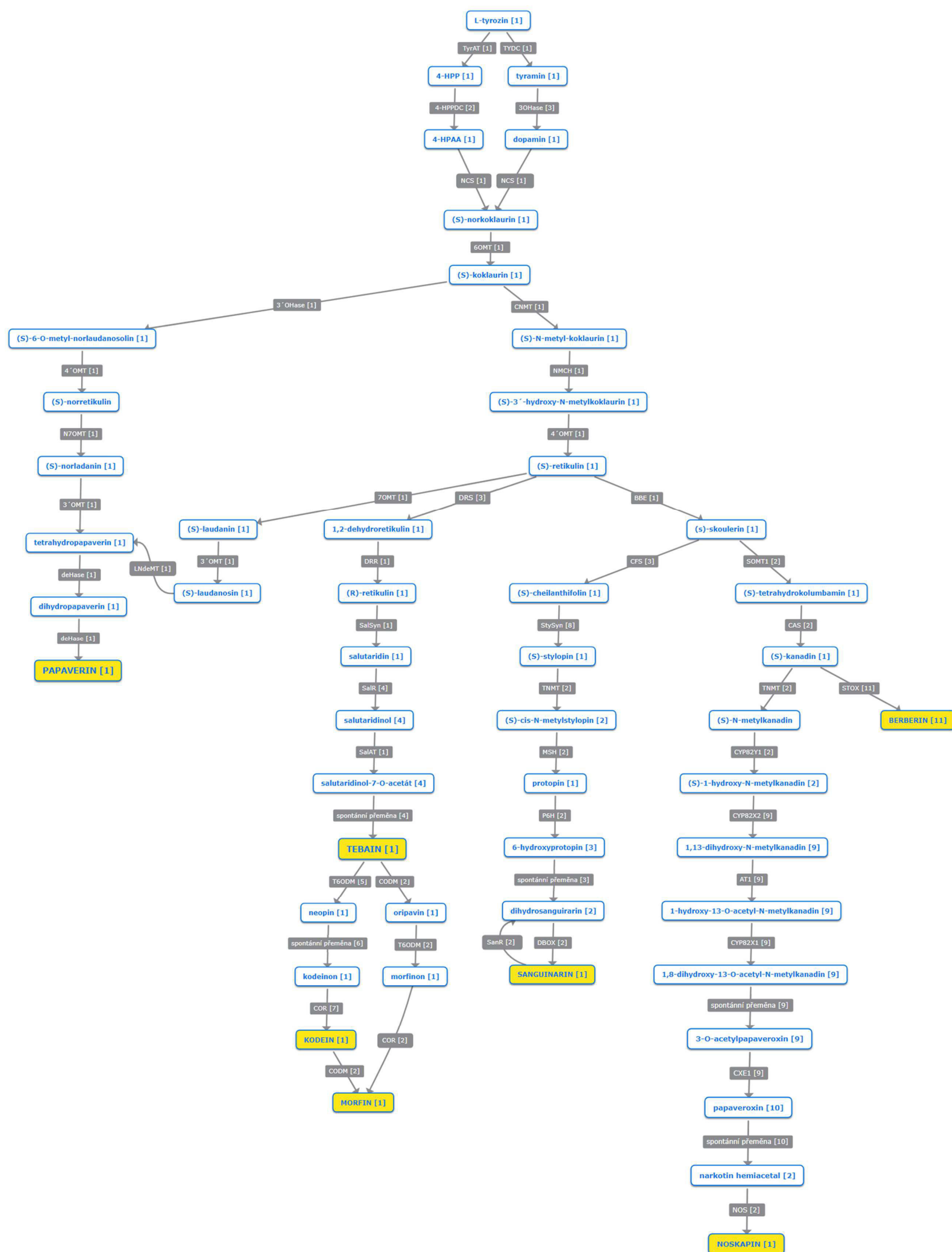
Biosyntéza alkaloidů probíhá syntézou v metabolicky aktivních pletivech jako jsou meristémy, pletiva iniciální, žláznatá, poraněné kambium a pravděpodobně i v mléčné šťávě. Alkaloidy jsou především ve formě soli kyseliny mekonové, sírové a mléčné, pouze narkotin je volný. Akumulace alkaloidů je nejvyšší v období dvou týdnů od počátku odpadání korunních plátků. Syntéza není kontinuální a v průběhu dne dochází k jejich tvorbě a odbourávání. Jednotlivé alkaloidy se tvoří různě během vývoje rostliny. Určitá shoda je sledována pouze u některých dvojic alkaloidů, a to kodeinu a tebainu, noskapiinu a narkotolinu, morfinu a papaverinu. V raném období vývoje rostliny se tvoří spíše vedlejší alkaloidy. Od období vývinu pupat se v nadzemních částech rostliny tvoří kodein, tebain a norkatin. Morfin se začíná v rostlině hromadit až po ukončení fáze růžice listů a současně s narkotolinem a papaverinem se tvoří až do opiové (technické) zralosti (Vašák *et al.*, 2010).

Samotná syntéza začíná kondenzací dvou derivátů L-tyrozinu (Pathak *et al.*, 2013). Z nich postupně vzniká dopamin a 4-HPAA, které se spojí Pictet-Spenglerovou kondenzací katalyzovanou enzymem NCS (Facchini *et De Luca*, 2008). Z tohoto spojení vznikne (S)-norkoklaurin, tj. první hlavní prekurzor několika biosyntetických drah, včetně dalšího meziprojektu - (S)-retikulinu (Wijekoon *et Facchini*, 2011). (S)-retikulin může být oxidován na (S)-skoulerin enzymem BBE, což je klíčový krok k tvorbě sanguinarinu a berberinu, nebo může být oxidován enzymem DRS, to vede

k tvorbě (R)-retikulinu a dále k syntéze morfinanových alkaloidů – tebain, kodein a morfin (Hagel *et al.*, 2012).

Konverze jednotlivých alkaloidů zahrnuje mnoho enzymatických kroků (Wijekoon *et Facchini*, 2011). Biosyntéza alkaloidů je tedy energeticky velmi náročná (Vašák *et al.*, 2010).

V následujícím obr. č. 5 je zobrazena biosyntetická dráha papaverinu, tebainu, kodeinu, morfinu, berberinu, noskapinu a sanguinarinu.



Obr. č. 5 Biosyntetická dráha alkaloidů morfinu, thebainu, kodeinu, sangunarinu, berberinu, papaverinu a noskapinu.

Seznam autorů: [1] Desgagné-Penix *et* Facchini, 2012, [2] Beaudoin *et* Facchini, 2014, [3] Facchini *et* De Luca, 2008, [4] Onoyovwe *et* al., 2013, [5] Schläger *et* Dräger, 2015, [6] Wijekoon *et* Facchini, 2011, [7] Weid *et* al., 2004, [8] Desgagné-Penix *et* al., 2010, [9] Chen *et* al, 2015, [10] Dang *et* Facchini, 2014, [11] Hagel *et* al., 2012

Seznam zkratk je uveden na konci diplomové práce

2.3 Základní aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin

2.3.1 Molekulární markery

Obecně termín molekulární markery označují technologii, která využívá fenotyp nebo blízkce příbuzné geny k nalezení podobností nebo rozdílů mezi jednotlivými rostlinami, odrůdami nebo šlechtitelskými liniemi. Analýzou molekulárních markerů mohou být již ve fázi sazenic vybrány rostliny s užitečným fenotypem (Koh *et al.*, 2015).

Genetický marker je jakýkoliv znak, který lze měřit v organismu a který poskytuje informace o genotypu. Genetickým markerem může být fenotypový znak, biochemická vlastnost nebo molekulární znak. Zatímco fenotypové markery závisí na expresi genů a jsou omezeny tím, zda jsou geny exprimovány, v jakém čase a za jakých podmínek, DNA markery poskytují téměř neomezený přísun markerů, které identifikují specifické sekvence v celém genomu. Jejich výhody jsou identifikace změn bází v DNA a mohou být v nekódujících nebo repetitivních oblastech (Walker *et Rapley*, 2009).

Genetické markery se dělí na:

- morfologické markery – jsou využívány k detekci např. tvaru nebo barvy rostliny. Jejich výhody jsou snadné stanovení a nízká cena. Nevýhody – vysoká závislost na vnějších podmínkách, obtížná analýza kvantitativních znaků a obtížnost určit heterozygotnost.
- proteinové markery jako např. isozymy rozlišují jednotlivé rostliny. Výhodou těchto markerů je nízká cena, kodominantnost a menší závislost na vnějším prostředí. Nevýhodou je nestabilní proteinový materiál a testované vzorky musejí být v dobré kondici.
- DNA markery – dělí se na markery založené na hybridizaci (polymorfismus délky restričních fragmentů – RFLP) a na polymerázové řetězové reakci – PCR (tandemové opakování krátkých motivů – SSR, polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů – AFLP, náhodná amplifikace polymorfní DNA – RAPD). DNA marker se používá k snadnému rozlišení cílového znaku (Koh *et al.*, 2015).

Genetická diverzita máku setého je nízká (Acharya *et* Sharma, 2009). Rozlišení odrůd máku setého je založena zejména na popisu fenotypu, morfologických a agronomických znaků. Tento postup však nemůže jednoznačně od sebe odrůdy rozlišit. V tomto ohledu by právě molekulární markery mohli pomoci při studiu diverzity (Masárová *et al.*, 2015). Mák jako důležitá plodina je málo prostudovaná. Specifické molekulární markery jsou potřebné k získání více informací o genetické kontrole užitečných vlastností máku a jejich zlepšení cíleným šlechtěním (Şelale *et al.*, 2013).

2.3.1.1 RFLP

RFLP analýza používá jednu nebo více endonukleáz k rozstříhání genomické DNA (Henry, 2013). Endonukleázy jsou obvykle dlouhé 4–8 bází a palindromické (Old *et* Primrose, 1994). Rozdíly v sekvenci DNA vedou k odlišným restrikcčním místům, a to je příčinou různých délek fragmentů. Rozdělení fragmentů DNA probíhá pomocí gelové elektroforézy na základě délky a počtu fragmentů (Henry, 2013). Poté je vzorek přenesen na membránu a proběhne hybridizace se značenou sondou. RFLP markery jsou většinou kodominantní, umožňují rozlišení homozygota a heterozygota (NCBI¹, 2019).

2.3.1.2 SSR

Mikrosatelity známé jako jednoduché opakující se sekvence (Koh *et al.*, 2015), obsahují 1–6 bází (Şelale *et al.*, 2013). Mikrosatelity tvoří velký podíl v genomu rostlin (Walker *et* Rapley, 2009) a nachází se jak v kódujících oblastech, tak v nekódujících (Sorkheh *et al.*, 2016). Po jejich nalezení se navrhnou většinou kodominantní primery (Koh *et al.*, 2015), které amplifikují mikrosatelitní sekvenci a mohou se tak identifikovat různé druhy či odrůdy (Walker *et* Rapley, 2009).

2.3.1.3 RAPD

Tato metoda nevyžaduje předchozí znalost sekvence, je založená na amplifikaci náhodných úseků DNA s jedním cca 10 bázovým primerem na základě homologních sekvencí zkoumané DNA (Walker *et* Rapley, 2009). Fragmenty jsou poté separovány pomocí gelové elektroforézy. Vytvořit RAPD markery je relativně jednoduché a analýza výsledků také, nejsou ale reprodukovatelné (Koh *et al.*, 2015). Téměř

všechny RAPD markery jsou dominantní, takže nerozeznáme heterozygota od homozygota (NCBI², 2019).

2.3.1.4 AFLP

Metoda umožňuje charakterizaci kompletní genomové DNA. Využívá prvků RFLP a PCR. DNA je rozštěpena dvěma restriktázami. Na konce, které vznikly jsou ligázou přidány adaptory. Takto připravená DNA se amplifikuje metodou PCR. Využívají se primery, které jsou komplementární k adaptorům. Produkty se poté separují pomocí gelové elektroforézy (Koh *et al.*, 2015).

3. Cíl práce

- 1) Na základě literární rešerše vytvořit schéma biosyntetické dráhy vybraných alkaloidů
- 2) Navrhnout primery pro vybrané geny biosyntetické dráhy alkaloidů
- 3) Optimalizovat PCR reakci pro amplifikaci a následné sekvenování co nejdelších fragmentů vybraných genů pro účely detekce mutací ve vybraných genech

4. Materiál a metodika

Jako výchozí materiál pro analýzu sekvencí vybraných genů jsem použila semínka odrůd Onyx a Orel, které mi poskytli šlechtitelé z Osevy PRO. Ze semínek jsem vypěstovala malé rostlinky. DNA jsem poté izolovala z děložních lístků.

Odrůda Onyx

Odrůda Onyx patří do modrosemenných typů se středně až vysokým obsahem morfinu. Tato odrůda je určena k produkci semene pro potravinářské účely a makoviny pro farmaceutický průmysl. Řadí se do raných až středně raných odrůd, rostliny jsou nízké až středně vysoké a odolné vůči poléhání. Typem je tato odrůda tzv. „slepák“ (makovice zůstává zavřená) a málo se u ní vyskytuje typ „hledák“ (otevírání makovic, vypadávání semen a tím způsobené ztráty). Obsah oleje v semeni je středně vysoký. Odrůda byla registrována v roce 2016 (EAGRI¹, 2018). V roce 2018 byla pěstitelská plocha 12,22 ha, tj. 4,21 % z celkových pěstitelských ploch máku setého v ČR (EAGRI², 2018).

Odrůda Orel

Středně raná odrůda Orel je určena pro produkci semene pro potravinářské účely. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké a současně středně odolné až odolné proti poléhání. Jedná se o odrůdu typu „slepák“, výskyt „hledáků“ je u ní nízký až středně vysoký. Obsah oleje v semeni vysoký, obsah morfinu nízký až středně vysoký, semeno je bílé, atypické chuti (oříškové). Registrace odrůdy proběhla v roce 2008 (EAGRI, 2016). V roce 2018 byla pěstitelská plocha 10,85 ha, tj. 3,73 % z celkových pěstitelských ploch máku setého (EAGRI², 2018).

4.1 Návrh primerů

Pro návrh primerů jsem použila program Primer 3 Input. Sekvence genů byla získána z databáze NCBI (Benson *et al.*, 2018).

1) Návrh primerů má specifická pravidla:

- Délka primerů 18–25 nukleotidů
- Podíl cytosinu a guaninu by měl být v rozmezí 45–75 %
- Rovnoměrné rozmístění G/C a A/T oblastí

- Teplota tání 55–75 °C, rozdíl mezi primery maximálně 2 °C
- 2) Zadala jsem sekvenci genu, pro který jsem chtěla navrhnout primer. Sekvence musí být ve FASTA formátu.
 - 3) Vybrala jsem nejvhodnější variantu páru primerů a otestovala je na vznik vlásenek a dimerů v programu Vector NTI. Síla vazby může být od -5 do 2 kcal/mol.
 - 4) Primery jsem zkopírovala do programu Primer-BLAST na webových stránkách <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> a zkontrolovala si, zda primery nenasedají ještě na jiných místech.

4.2 Izolace DNA

Na izolaci DNA jsem použila metodu CTAB-PVP.

- Předehřála jsem si extrakční pufr (495 μ l CTAB pufru + 5 μ l β -merkaptoethanolu)
- Do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek jsem dala cca 200 mg listů máku, přidala předehřátý extrakční pufr a zhomogenizovala
- Inkubace vzorku 10 minut při 65 °C a během inkubace jsem 1x vzorek promíchala
- Dále jsem centrifugovala 5 minut při 21 °C a přepipetovala vodnou fázi do nových zkumavek
- Přidala jsem 500 μ l chloroformu-IAA a nechala 5 minut protřepávat
- Centrifugace 5 minut při 21 °C
- Opět jsem přepipetovala jsem vodnou fázi do nových zkumavek a přidala 2/3 objemu izopropanolu a vzorek jsem promíchala
- Inkubace 10 minut při -20 °C
- Centrifugace 5 minut při 4 °C, poté jsem vzorek co nejvíce vysušila
- Přidala jsem 1 ml ledového 70% ethanolu a centrifugovala 5 minut při 4 °C
- Odstranila jsem supernatant a usušila pelet
- Pelet jsem rozpustila ve 100 μ l TE pufru

- DNA jsem uchovávala při -20 °C

4.3 Polymerázová řetězová reakce

Po navrhnutí primerů jsem potřebovala otestovat jejich specifitu a teplotu annealingu – to jsem dělala pomocí gradientové PCR. PCR reakci jsem namíchala v 10 µl.

Složení PCR:

- 5 µl master mix
- 3 µl H₂O
- 0,5 µl forward primeru
- 0,5 µl reverse primeru
- 1 µl DNA

Průběh gradientové PCR:

- 1) počáteční denaturace 94 °C, 10 min
- 2) denaturace 94 °C, 30 s
- 3) annealing 55–62 °C, 30 s
- 4) elongace 72 °C, 90 s
- 5) koncová elongace 72 °C, 10 min

Body 2 až 4 se cyklicky opakovali 35x.

4.4 Elektroforéza

- Do erlenmeyerovy baňky jsem si navázila 1,5 g agarózy
- Přidala jsem 110 ml TBE pufry a promíchala
- Roztok jsem dala do mikrovlnné trouby na cca 2 minuty, po vyndání jsem zkontrolovala, zda je agaróza úplně rozpuštěna
- Poté jsem tekutý gel zchladila
- Přidala do něj 4 µl ethidium bromidu a promíchala

- Do připravené elektroforetické vany s hřebeny jsem gel nalila – hřebeny jsem ještě vyndala, abych se ujistila, že gel zatekl všude a nejsou v něm bubliny
- Gel jsem nechala ztuhnout
- Po ztuhnutí jsem vyndala hřebeny a přenesla je do vany s TBE pufrem
- Na první místo jsem nanesla velikostní marker (ladder), do dalších jamek jsem dala 9 μ l PCR produktu
- Zapnula jsem proud na 100 V po dobu 45 minut

4.5 Sekvenování

Vzorek jsem si připravila pomocí PCR. Abych si zkontrolovala správnost nasedání primerů a amplifikaci produktu reakci jsem namíchala v 25 μ l z nichž jsem 9 dala na gel.

Po zkontrolování produktu na gelu jsem ho přečistila pomocí enzymu ExoSap. 2 μ l enzymu jsem přidala k mému produktu.

Průběh reakce:

- Inkubace 15 minut při 37 °C
- Inkubace 15 minut při 80 °C
- Nakonec jsem přidala 5 μ l forward primeru

Takto připravený vzorek jsem poslala do firmy SEQme na sekvenční analýzu.

5. Výsledky

5.1 Primery

Primery jsem navrhovala pro geny AY268893.1 – (*R,S*)-reticuline 7-*O*-methyltransferase (*7OMT*), DQ028579.1 – (*S*)-tetrahydroprotoberberine *N*-methyltransferase (*TNMT*) a GQ500141.1 – Codeine *O*-demethylase (*CODM*).

Gen *7OMT* kóduje enzym retikulín 7-*O*-methyltransferázu, který katalyzuje metylaci (*S*)-retikulínu na (*S*)-laudanin (Beaudoin *et* Facchini, 2014).

Gen *TNMT* kóduje enzym tetrahydroprotoberberin *N*-methyltransferázu, který katalyzuje přeměnu (*S*)-stylopinu na (*S*)-cis-methylstylopin v sanguinarinové dráze a (*S*)-kanadinu na (*S*)-*N*-methylkanadin v noskapinové dráze (Alagöz *et al.*, 2016).

Gen *CODM* kóduje enzym kodein-*O*-demetylázu, který katalyzuje *O*-demetylaci kodeinu na morfin a také přeměnu tebainu na oripavin v morfinové dráze (Onoyovwe *et al.*, 2013).

Sekvenci zkoumaných genů jsem rozdělila na dvě poloviny, aby při sekvenování byla pokrytá co největší část sekvence daného genu. Každý primerový pár obsahuje jeden forward (F) a jeden reverse primer (R). V tabulkách č. 2, 3, 4 je přehled mnou navržených primerů pro geny *7OMT*, *TNMT* a *CODM*. Zeleně jsou vyznačeny primery, které byly použity pro sekvenační analýzu.

Název primeru	Sekvence 5' → 3'	Pozice	Počet bází
AY268893.1 1/2	GCT CAT CCA CAC ATA CAA GGC	1. pol. genu	21
AY268893.1 1/2	TTG TGT GTT GCG ACC AGA TG	1. pol. genu	20
AY268893.1 1/2	GGC ATT GAA ATG TGC AGT TG	1. pol. genu	20
AY268893.1 1/2	GTT GAT TGT GTG TTG CGA CC	1. pol. genu	20
AY268893.1 1/2	GGG CAA GCT GAA ATA TGG GAG	1. pol. genu	21
AY268893.1 1/2	GCA TGT CGG TGG TGA TAT GT	1. pol. genu	20
AY268893.1 2/2	TTT CCT TAA CGG TGC AAT GC	2. pol. genu	20
AY268893.1 2/2	TGC TAT CCT TAG ACA TCT GGG G	2. pol. genu	22
AY268893.1 2/2	TCA ACG AGA TGC TGC TTG AA	2. pol. genu	20
AY268893.1 2/2	TCC TGT GAG AGA GCT GTT ACC	2. pol. genu	21

Tab. č. 2: Navržené primery pro gen *7OMT* (AY268893.1)

Název primeru	Sekvence 5' → 3'	Pozice	Počet
DQ028579.1 1/2	AGG AAT CAG CAG GGG AAA	1. pol. genu	20
DQ028579.1 1/2	TTG GAG AAA GGC GCT AGA	1. pol. genu	20
DQ028579.1 1/2	TCC TCA CTA GCC TAG ACT GT	1. pol. genu	20
DQ028579.1 1/2	CAT TTG GAG AAA GGC GCT	1. pol. genu	21
DQ028579.1 2/2	CCA TGT TAC AGG GCT CAC	2. pol. genu	21
DQ028579.1 2/2	TGC GTT TTC CTG TTG TCT AG	2. pol. genu	20
DQ028579.1 2/2	AGG GCT CAC TAA TTC AAA	2. pol. genu	21
DQ028579.1 2/2	AAA CAA GCC AAA CCC CTG TG	2. pol. genu	20

Tab. č. 3: Navržené primery pro gen *TNMT* (DQ028579.1)

Název primeru	Sekvence 5' → 3'	Pozice	Počet
GQ500141.1 1/2	GGC TAA ACT CAC GCT TGC AG	1. pol. genu	20
GQ500141.1 1/2	TCA AAC CTC TAC CTG ATG CGT	1. pol. genu	21
GQ500141.1 1/2	GGA ATT GGC TAA ACT CAC GCT	1. pol. genu	21
GQ500141.1 1/2	AAC CTC TAC CTG ATG CGT TC	1. pol. genu	20
GQ500141.1 2/2	GGA GAC ACT GGA ATC CTA CCT	2. pol. genu	21
GQ500141.1 2/2	CTC TGT TTG GGT CAA GTG ATG T	2. pol. genu	22
GQ500141.1 2/2	TTG TTT CCA GAA CTC CCT CT	2. pol. genu	20
GQ500141.1 2/2	TTT CGT GGA TGA CTG AGA GA	2. pol. genu	20

Tab. č. 4: Navržené primery pro gen *CODM* (GQ500141.1)

Na obrázcích 6, 7, 8 jsou vyznačeny pozice primerů vybraných pro sekvenační analýzu. Žlutě jsou vyznačeny primery pro první polovinu genu, modře pro druhou polovinu genu.

GAAAACAAAACATAAACACAATTTATTTCAGAGATATCTGGATGGATACTGCAGAAGAAAAGGTTGAAAG
GGCAAGCTGAAATATGGGAGCATATGTTTCGCATTTCGTGGATTCAATGGCATTGAAATGTGCAGTTGAG
CTTGGCATAACCAGACATAATAAACTCTCATGGTTCGTCCGGTCCACAATATCTGAGATCGTCGACAGTTT
GAAAACAAAACACCCATCATCATCTCCCAACATCGATTATCTTACACGTATAAATGAGACTACTGGTTC
ACAAGAGGCTATTTACTTCTGAACTTCATCAAGAAAAGTAACCAACTTCTCTATAATTTAACTCGATCA
TCAAAATGGCTACTAAAAGATTCCAAGTTTAACTCTGTCACCACTGGTTTTATGGGAAACTAATCCGAT
ATTACTAAAACCATGGCAATATTTGGGCAAGTGTGCTCAAGAAAAAAGTTCTCCATTGAGAGAGCTC
ATGGATGTGAGATTTGGGATCTTGCTTTAGCTGATCCTAAGTTTAATAAATTTCCCTTAACGGTGCATG
CAATGTTTCGACTACAACAATAATCAACGAGATGCTGCTTGAATATAAAGATGGATTTAGTGGTATAGC
AGGATCGCTTGTGATGTGCGGGGTGGGACCGGGTCGATAATCGCTGAAATAGTTAAGGCTCATCCAC
ACATACAAGGCATCAATTTTGATCTACCACATGTAGTGGCTACAGCGGCTGAATTTCCAGGGGTGAAAG
CAITGTCGGTGGTGAITATGTTTGTGCAATTCGGGAAGCTGATGCTGTCATCATGAAGTGGATATTGCA
CGACTGGAGTGACGAAAGACTGTACAATTATACTGAAGAATTGTTACCGAGCAATAAGAAAAGAAAA
ACGGAAAAAGTCATAATTGTTGATTGTGTGTTGCGACCAGATGGAAATGACTTATTCGATAAAAATGGGA
TTGATATTTGATGTGCTGATGATGGCACATACTACAGCTGGAAAAGAAAAGAACAGAAAGCGGAATGGAA
GATCTTATTAATAATGCAGTTTTTCTCGTTACAATGTCATTCGAACTCCGGCATTTCCTTGCATCA
TCGAGGCCTTTCCAGAATAATGATCAAGGTGCAGCTATGGTAGCCCAACGATACTCTCAAGCTATATA
TATGATATTTCCAAAAGAAATGTGTTCTTTGTTGTGCATGTTTTGTAGAGTGTGGTAACTTTGGAAA
GACCATTTACAAATAGCTATGCTATTTGTTGGCTAGCTAAGGGTCAGGTTCCCTACAAAATAATTCAGA
ACTTTATGTTTTTGAGTGGTAATAAAAACAATTTCTCTGTGAGAGAGCTGTTACCTTGTCTGTTATCTG
TATTGCTATCCTTAGACATCTGGGGGGGTGGAATGTATTCTGATTTTGCCTTTTTACGTAAAAAAA
AAAAAAA

Obr. č. 6: Sekvence genu *7OMT* s vyznačenými primery

GGCACGAGATTCTCTTGCATTTCAATTTAGTCTTGTCTTCGTAGAAATCCACTTAGTTTTCTCCT
AGCCTAGACTGTATCATTATGGGTTCAATAGATGAGGTCAAGAAGGAATCAGCAGGGGAAACA
GAGATTGTTGAAAGGAGAGATTAAGATGAGGAACGAAGAAGCTGATTAAGTTTCAATTCGAGAAAC
GTCTGCAATGGGGTTATAAATCATCTCATCAAGAACAACCTCTCCTTCAACCTTGACTTCATTAATCC
TTAAAAAGATGGAAATGTCAGGAGAGATTGAGACAATGAACAAGGAAACCTATGAATTACCCTCAGA
ATCTTAGAGGACGTTTTTGGGAAAACGTCAAGCAAAAGTATGTGTTACTTACACATGAATCAGCAA
CAATGATCAGGAGCAGAAGAAGCTGCACATGAATTATACTGTGAACGAGCACAATAAAGACGGACAA
ACTGTTCTTGACATTGGTTGTGGTCAAGGTGGTCTAGTTCTATACATTGCTCAGAAATATAAGAAGCTG
CCATGTTACAGGGCTCACTAATTCAAAGGCACAAGTCAATTACTTACTCAAGCAAGCAGAGAAGCTTG
GGTTGACAAACGTCGACGCCATACTAGCAGATGTTACTCAGTATGAATCTGACAAGACATACGATCGT
CTACTTATGATTGAAGCCATAGAGCATATGAAAACTTACAGCTGTTTATGAAGAACTATCAACTTG
GATGACAAAAGAAAGTCTTCTCTTTGTGGACCACGTCTGCCACAAAACATTTGCTCACTTTTTTGGAG
CAGTCGATGAGGATGACTGGTACTCAGGTTTTCAATTTCCCCCAGGTTGTGCAACCATACTAGCTGCT
AATAGTCTCCTCTATTTCCAGGATGATGTTTCAAGTTGTGGATCATTGGGTTGTCAATGGAATGCACAT
GGCTCGTTCAGTAGACATTTGGAGAAAGGCGCTAGACA
AAAAATATGGAAGCTGCAAAAGAAATTCAT
TACCTGGACTTGGAGGAAGCCACGAAACAGTGAATGGAGTCGTTACTCACATTAGAACATTCTGTATG
GGAGGCTATGAACAATTCATGAACAATGGAGATGAGTGGATGGTTGCGCAGCTGCTTTTCAAGAA
GAAGTAGTGAGGCCATTTCCACGGCAACTGCATTTTCCAGAGCTGTGTAATAATGTGATCCTCAAGTA
ACAATAATTTGGGTTGTATCACAGGGGTTGGCTTGTTTTTGTTGTCTGCATTTCTACTTTGTTTTT
TCTTTTAAATTTGGATACAAGATTTGAAGAAGCTCATTTCGTAATTATATCATGTAATGGGTTGTCAAT
CAACAGGTGTGAGAAAATGTACCAACATTTGCGTTTTCTGTTGTCTAGTTATTTGTTACTTTATAT
TAAAAAAA

Obr. č. 7: Sekvence genu *TNMT* s vyznačenými primery

GTAAAGATTGATATATGATCTGAAGATCTGACAAGAAAGTTCATCAAATATAGAGTTCATGGAGACAC
 CAATACTTATCAAGCTAGGCAATGGTTTGTCAATACCAAGTGTTCAGGAATTGGCTAAACTCACGCTT
 GCAGAAATTCATCTCGATACACATGCACCGGTGAAAGCCCGTTGAATAATATTGGTGCCTGTGTAAC
 AGATGATGAAACAGTTCCTGTCAATCGATTGCAAAATTTACTATCTCCAGAACCCGTAGTTGGAAAGT
 TAGAATTGGATAAGCTTCATTCTGCTTGCAAAGAAATGGGGTTTCTTTACAGCTGGTTAACCATGGAGTC
 GACGCTTTACTGATGGACAATATAAAATCAGAAATTAAGGTTTCTTTAACCTTCCAATGAATGAGAA
 AACTAAATACGGACAGCAAGATGGAGATTTTGAAGGATTTGGACAACCCATATATTGAATCGGAGGACC
 AAAGACTTGATTGGACTGAAGTGTTTAGCATGTTAAGTCTTCTCTCCATTTAAGGAAGCCTCATTTG
 TTCCAGAACTCCCTCTGCCTTTCAGGGAGACACTGGAATCCTACCTATCAAAAATGAAAAACTATC
 AACGGTTGTCTTTGAGATGTTGGAAAAATCTCTACAATTAGTTGAGATTAAAGGTATGACAGACTTAT
 TTGAAGATGGGTTGCAACAATGAGGATGAACTATTATCCTCCTTGTCCCTCGACCAGAGCTTGTACTT
 GGTCTTACGTACACTCGGATTTTAGCGGTTTGACAATTCTCCTTCAACTTAATGAAGTTGAAGGATT
 ACAAATAAGAAAAGAAGAGAGGTGGATTTCAATCAAACTCTACCTGATGCGCTCATAGTGAATGTTG
 GAGACATTTTGGAGATAATGACTAATGGGATTTACCGTAGCGTCGAGCACCCGGGCAGTAGTAAACTCA
 ACAAAGGAGAGGCTCTCAATCGCGACATTTATGACTCTAAACTAGAGTCAGAAATAGGCCCAATTTT
 GAGCTTGGTACACCAGAGACACCTGCTTTGTTCAAAAGAGGTAGGTATGAGGATATTTTGAAGGAAA
 ATCTTCAAGGAAGCTTGATGGAAAATCATTCTCGACTACATGAGGATGTGAGAAAAGTGTGAACATA
 TATTACTCCACATTTGTTTAAATATATGATGAAATAAGTTGCTTTTGAAGTATGATGAAATAAGTT
 GGTTTTGAAGAATTCATATTGTGCTTAAATTTTCGTGGATGACTGAGAGATTTATTATGTAATAATAAT
 GTATTGGTTTGAAGATTCTCGTCTCACTATATGTAAGACTCTGTTTGGGTCAAGTGTATGTAATCACGG
 TTGAAATAAGTTGCTTTTGAAGAATTCATATGGTGTCTTAAATATTATGTAATAATAATAATGTATTGGATT
 GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

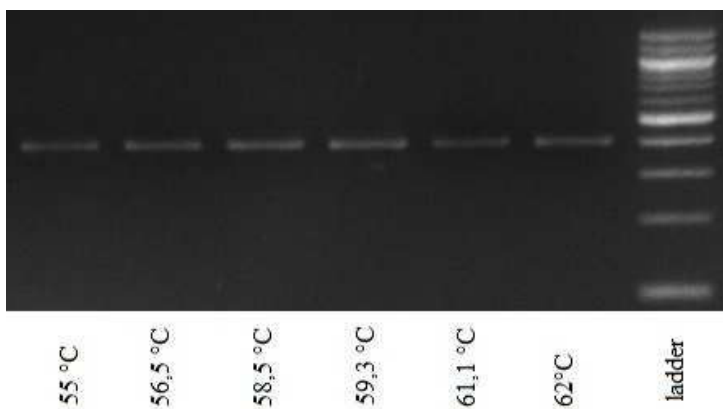
Obr. č. 8: Sekvence genu CODM s vyznačenými primery

5.2 Gradientová PCR a sekvenování

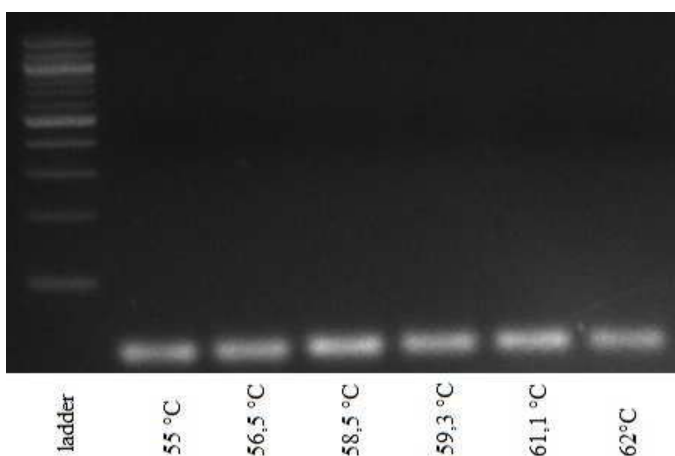
5.2.1 Optimalizace primerů pro sekvenování genu *7OMT*

Pro tento gen jsem navrhla celkem pět párů primerů. Tři páry primerů jsou pro první polovinu genu a dva páry pro druhou polovinu genu.

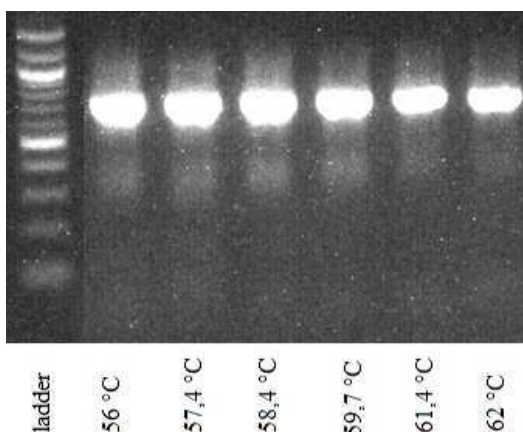
Při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R1 amplifikace proběhla specificky při všech testovaných teplotách. Amplifikované fragmenty neměly očekávanou délku (obr. č. 9). Primerový pár AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R2 netvořil fragment při žádné z testovaných teplot (obr. č. 10). Amplifikace primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R3 byla při všech testovaných teplotách nespecifická (obr. č. 11). Výsledky testování primerů ukazují, že tyto primery nejsou vhodné pro optimalizaci PCR reakce.



Obr. č. 9: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. 55 °C, 2. 56,5 °C, 3. 58,5 °C, 4. 59,3 °C, 5. 61,1 °C, 6. 62 °C, 7. velikostní marker

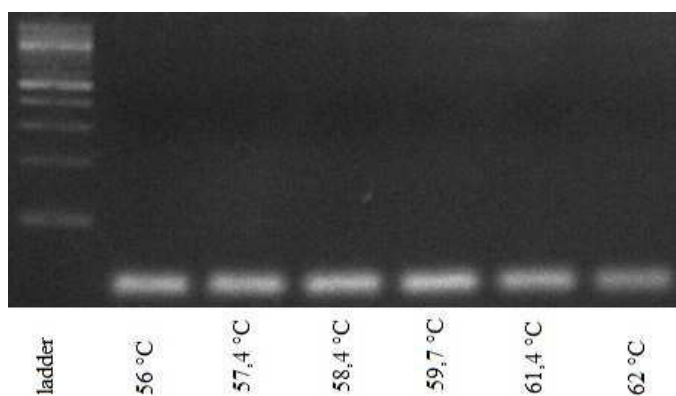


Obr. č. 10: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 55 °C, 3. 56,5 °C, 4. 58,5 °C, 5. 59,3 °C, 6. 61,1 °C, 7. 62 °C

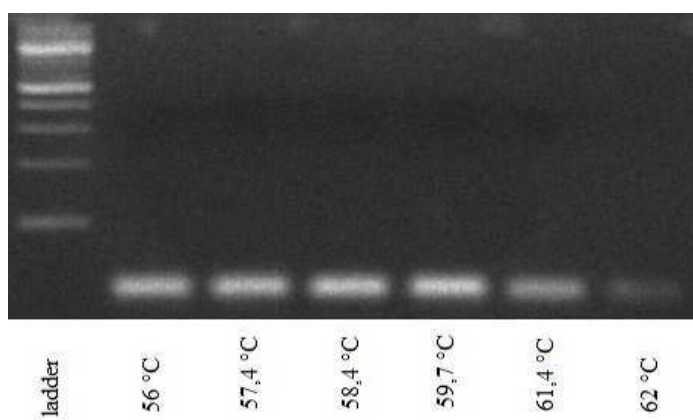


Obr. č. 11: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R3 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 56 °C, 3. 57,4 °C, 4. 58,4 °C, 5. 59,7 °C, 6. 61,4 °C, 7. 62 °C

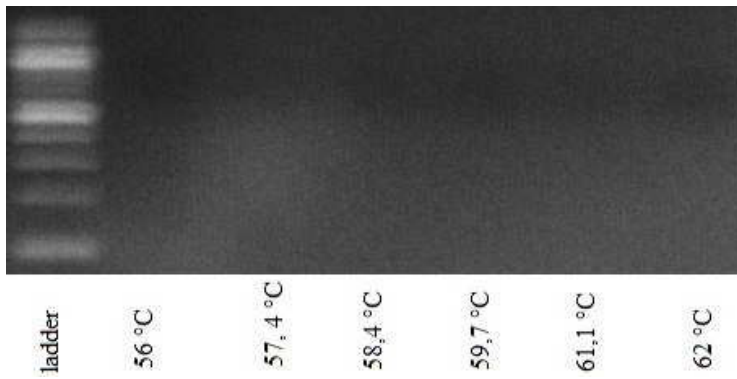
Na základě vyhodnocení získaných výsledků jsem pokračovala testováním kombinací forward a reverse primerů první poloviny genu *7OMT*. Primerové páry AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R2 (obr. č. 12), AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R3 (obr. č. 13) a AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R1 (obr. č. 14) netvořily fragmenty při žádné z testovaných teplot. Primerový pár AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R1 amplifikoval fragmenty nespecificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 15). Primerový pár AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R2 také amplifikoval fragmenty nespecificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 16). U teploty 59,7 °C došlo k chybnému pipetování PCR produktu, proto na výsledném gelu není zobrazen fragment. U primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R3 proběhla specifická amplifikace při všech testovaných teplotách (obr. č. 17). Na základě gradientové PCR byl zvolen primerový pár AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R3 s optimální teplotou nasedání 61 °C.



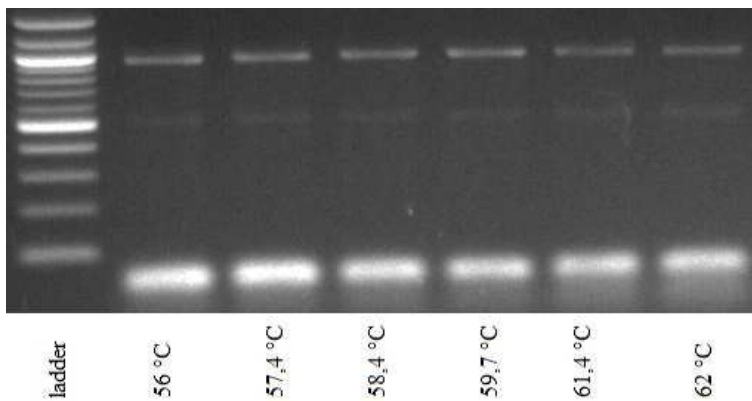
Obr. č. 12: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 56 °C, 3. 57,4 °C, 4. 58,4 °C, 5. 59,7 °C, 6. 61,4 °C, 7. 62 °C



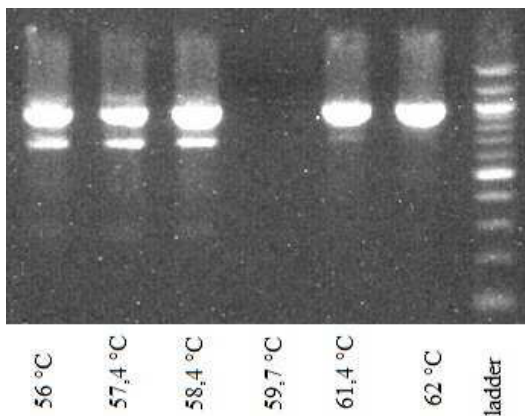
Obr. č. 13: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R3 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 56 °C, 3. 57,4 °C, 4. 58,4 °C, 5. 59,7 °C, 6. 61,4 °C, 7. 62 °C



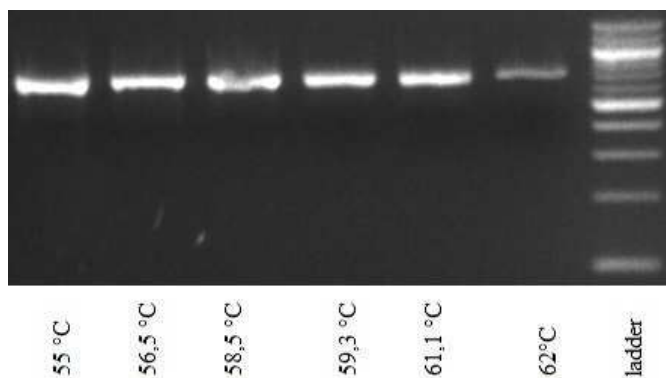
Obr. č. 14: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 56 °C, 3. 57,4 °C, 4. 58,4 °C, 5. 59,7 °C, 6. 61,1 °C, 7. 62 °C



Obr. č. 15: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 56 °C, 3. 57,4 °C, 4. 58,4 °C, 5. 59,7 °C, 6. 61,4 °C, 7. 62 °C

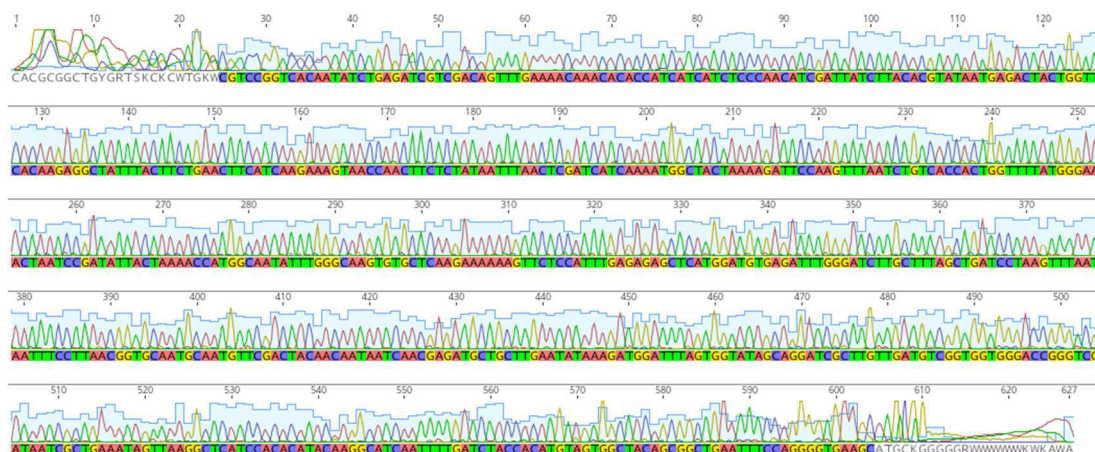


Obr. č. 16: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. 56 °C, 2. 57,4 °C, 3. 58,4 °C, 4. 59,7 °C (chyba při pipetování), 5. 61,4 °C, 6. 62 °C, 7. velikostní marker



Obr. č. 17: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R3 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. 55 °C, 2. 56,5 °C, 3. 58,5 °C, 4. 59,3 °C, 5. 61,1 °C, 6. 62 °C, 7. velikostní marker

Na obr. č. 18 je znázorněna sekvence fragmentu získaného PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R3. Čitelnou sekvencí se podařilo získat pouze z PCR produktu, u kterého byl pro reakci použit vzorek DNA z rostlinného materiálu odrůdy Onyx.

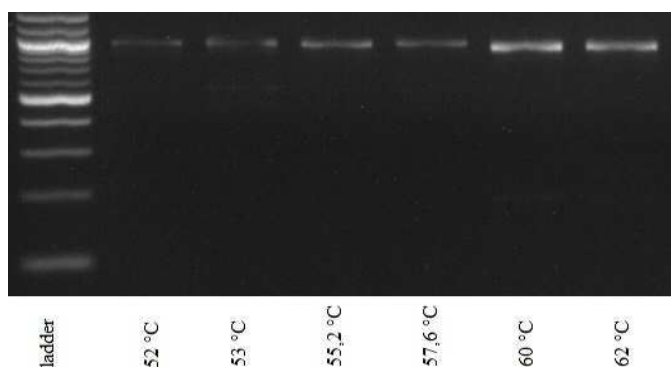


Obr. č. 18: Sekvence 1/2 genu *70MT* – odrůda Onyx

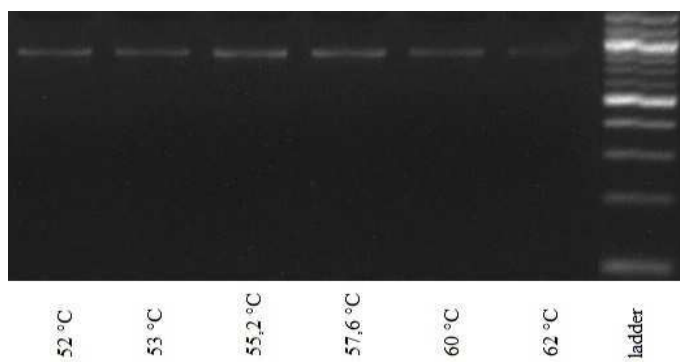
Pro druhou polovinu genu *70MT* jsem navrhla dva páry primerů. Primerový pár AY268893.1 2/2 F1 + AY268893.1 2/2 R1 amplifikoval fragmenty specificky při teplotách 52 °C; 53 °C; 55,2 °C a 57,6 °C; při teplotách 60 °C a 62 °C se netvořily fragmenty (obr. č. 19). Primerový pár AY268893.1 2/2 F2 + AY268893.1 2/2 R2 amplifikoval fragmenty při teplotách 52 °C, 53 °C, 55,2 °C a 57,6 °C nespecificky, při teplotě 60 °C specificky a při 62 °C se fragment netvořil (obr. č. 20). Na základě gradientové PCR byl zvolen primerový pár AY268893.1 2/2 F1 + AY268893.1 2/2 R1 s optimální teplotou nasedání 57 °C.

5.2.2 Optimalizace primerů pro sekvenování genu *TNMT*

Pro první polovinu genu *TNMT* jsem navrhla dva páry primerů. Primerový pár DQ028579.1 1/2 F1 + DQ028579.1 1/2 R1 amplifikoval fragmenty specificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 22). Primerový pár DQ028579.1 1/2 F2 + DQ028579.1 1/2 R2 amplifikoval fragmenty specificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 23). Na základě gradientové PCR byl zvolen primerový pár DQ028579.1 1/2 F1 + DQ028579.1 1/2 R1 s optimální teplotou nasedání 60 °C.

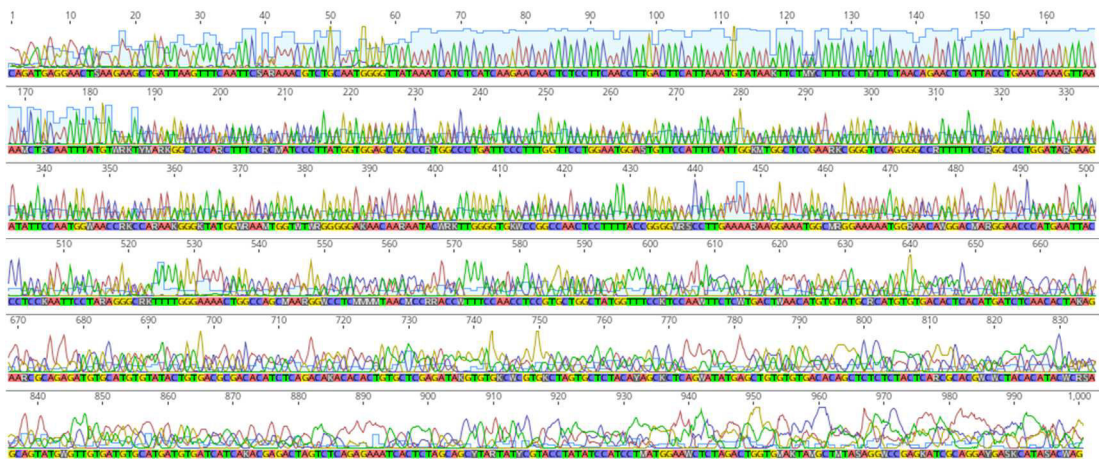


Obr. č. 22: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 1/2 F1 + DQ028579.1 1/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 52 °C, 3. 53 °C, 4. 55,5 °C, 5. 57,6 °C, 6. 60 °C, 7. 62 °C



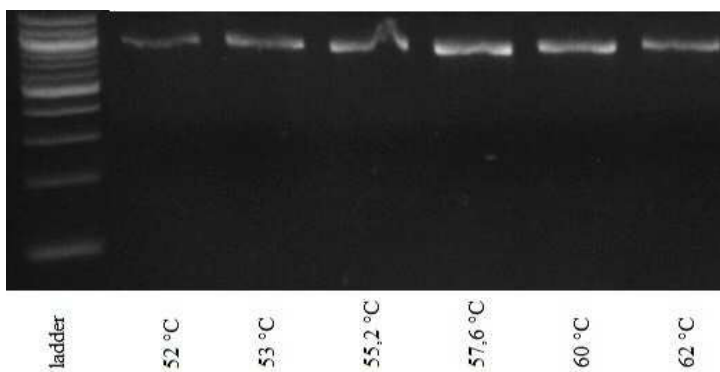
Obr. č. 23: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 1/2 F2 + DQ028579.1 1/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 52 °C, 3. 53 °C, 4. 55,5 °C, 5. 57,6 °C, 6. 60 °C, 7. 62 °C

Na obr. č. 24 je znázorněna sekvence fragmentu získaného PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 1/2 F1 + DQ028579.1 1/2 R1. Čitelnou sekvenci se podařilo získat pouze z PCR produktu, u kterého byl pro reakci použit vzorek DNA z rostlinného materiálu odrůdy Onyx.

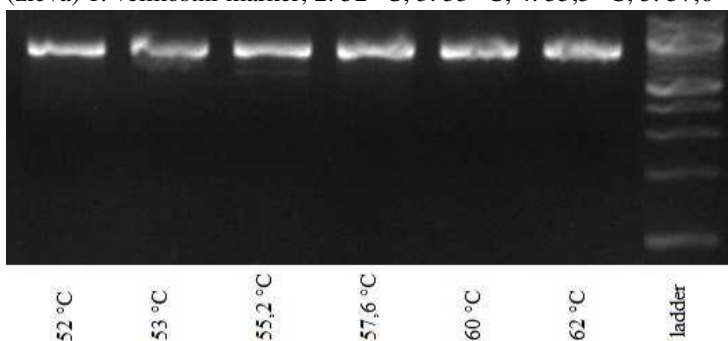


Obr. č. 24: Sekvence 1/2 genu *TNMT* – odrůda Onyx

Pro druhou polovinu genu *TNMT* jsem navrhla dva páry primerů. Primerový pár DQ028579.1 2/2 F1 + DQ028579.1 2/2 R1 amplifikoval fragmenty specificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 25). Primerový pár DQ028579.1 2/2 F2 + DQ028579.1 2/2 R2 amplifikoval fragmenty specificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 26). Na základě gradientové PCR byl zvolen primerový pár DQ028579.1 1/2 F2 + DQ028579.1 1/2 R2 s optimální teplotou nasedání 58 °C.

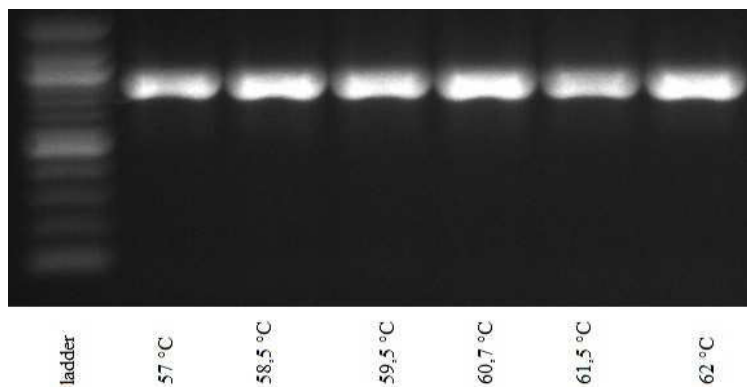


Obr. č. 25: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 2/2 F1 + DQ028579.1 2/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 52 °C, 3. 53 °C, 4. 55,5 °C, 5. 57,6 °C, 6. 60 °C, 7. 62 °C

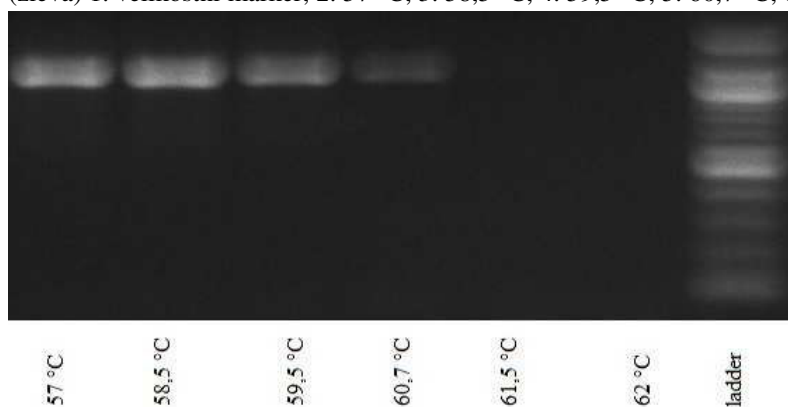


Obr. č. 26: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 2/2 F2 + DQ028579.1 2/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 52 °C, 3. 53 °C, 4. 55,5 °C, 5. 57,6 °C, 6. 60 °C, 7. 62 °C

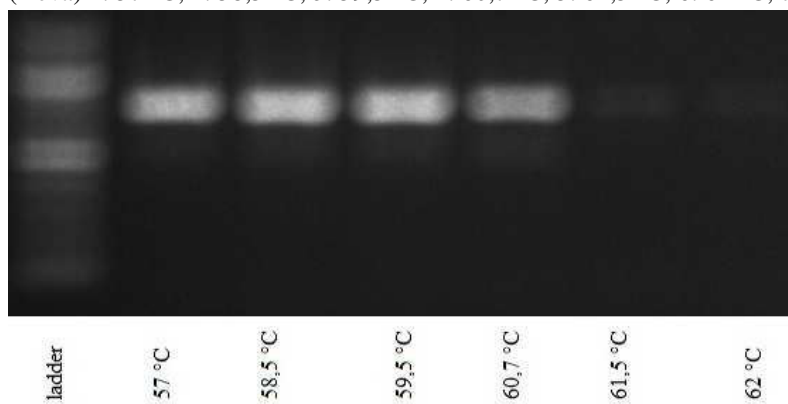
(obr. č. 33). Primerový pár GQ500141.1 2/2 F1 + GQ500141.1 2/2 R2 amplifikoval fragmenty nespecificky při všech testovaných teplotách (obr. č. 34). Primerový pár GQ500141.1 2/2 F2 + GQ500141.1 2/2 R1 netvořil fragmenty (obr. č. 35). Na základě gradientové PCR nebyl zvolen ani jeden primerový pár pro tuto polovinu genu.



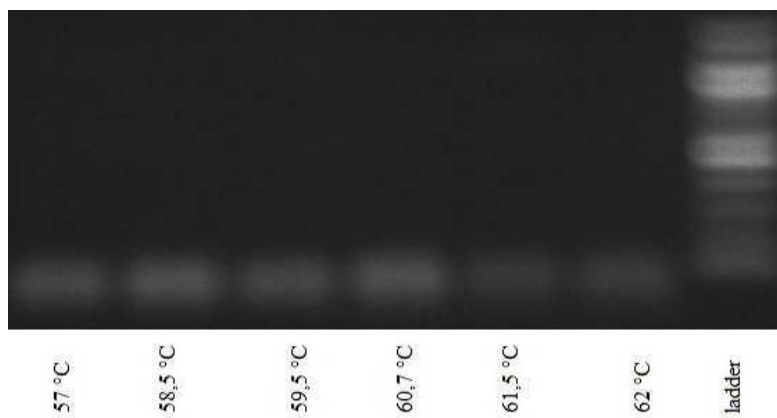
Obr. č. 32: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F1 + GQ500141.1 2/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 57 °C, 3. 58,5 °C, 4. 59,5 °C, 5. 60,7 °C, 6. 61,5 °C, 7. 62 °C



Obr. č. 33: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F2 + GQ500141.1 2/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. 57 °C, 2. 58,5 °C, 3. 59,5 °C, 4. 60,7 °C, 5. 61,5 °C, 6. 62 °C, 7. velikostní marker



Obr. č. 34: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F1 + GQ500141.1 2/2 R2 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. velikostní marker, 2. 57 °C, 3. 58,5 °C, 4. 59,5 °C, 5. 60,7 °C, 6. 61,5 °C, 7. 62 °C



Obr. č. 35: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F2 + GQ500141.1 2/2 R1 při různých teplotách annealingu; pořadí ve sloupcích (zleva) 1. 57 °C, 2. 58,5 °C, 3. 59,5 °C, 4. 60,7 °C, 5. 61,5 °C, 6. 62 °C, 7. velikostní marker

6. Diskuze

Cílem práce bylo na základě literární rešerše sestavit biosyntetickou dráhu vybraných alkaloidů, navrhnout primery pro vybrané geny biosyntetické dráhy alkaloidů a optimalizovat PCR reakci pro amplifikaci.

Desgagné-Penix *et Facchini* (2012) uvádějí, že nejdůležitější alkaloidy máku setého jsou morfin, kodein, tebain, papaverin a noskapin. Labanca *et al.* (2018) k těmto alkaloidům ještě přidává sanguinarin a berberin. Na základě těchto informací jsem sestavila biosyntetickou dráhu vyjmenovaných alkaloidů.

Jako kostru biosyntetické dráhy alkaloidů jsem použila dráhu sestavenou Desgagné-Penix *et Facchini* (2012). V tomto výzkumu byla objasněna biosyntetická dráha papaverinu. Tuto základní kostru jsem rozvíjela podle Beaudion *et Facchini* (2014). Jejich výzkum mi osvětlil další enzymy a meziprodukty v biosyntetické dráze morfinu, kodeinu a sanguinarinu. Dle Onoyovwe *et al.* (2013), Schläger *et Dräger* (2015), Wijekoon *et Facchini* (2011) a Weida *et al.* (2004) jsem doplnila zbylé nejasnosti v biosyntetické dráze tebainu, kodeinu a morfinu. Chen *et al.* (2015) a Dang *et Facchini* (2014) se zabývali dráhou noskapinu a na základě tohoto výzkumu jsem zjistila jeho biosyntetickou dráhu.

Biosyntéza alkaloidů je závislá na schopnosti enzymů katalyzovat klíčové reakce prostřednictvím genů (Onoyovwe *et al.*, 2013). Po sestavení biosyntetických drah hlavních alkaloidů jsem pro testování vybrala geny *7OMT*, *TNMT* a *CODM*, pro tyto geny, které se mi podařilo najít v databázi NCBI (Benson *et al.*, 2018) sekvenci. Pro tyto geny jsem navrhla primery.

Celkem jsem pro vybrané tři geny navrhla 13 párů primerů. Pět párů primerů se mi podařilo optimalizovat. První pár primerů byl úspěšně optimalizován pro první polovinu genu *7OMT*, druhý pár pro druhou polovinu genu *7OMT*, třetí pár pro první polovinu genu *TNMT*, čtvrtý pár pro druhou polovinu genu *TNMT* a pátý pár pro první polovinu genu *CODM*. PCR produkty pro tyto části genů byly zaslány na sekvenační analýzu.

Pro sekvenační analýzu byly použity odrůdy Onyx a Orel. Sekvenační analýza u odrůdy Onyx byla úspěšně provedena se všemi optimalizovanými primerovými páry. U odrůdy Orel byla úspěšná analýza jen u první poloviny genu *CODM* při použití primerového páru GQ500141.1 1/2 F2 + GQ500141.1 1/2 R2. Výsledkem PCR reakce

odrůdy Orel byl dle mého názoru specifický fragment u všech pěti párů primerů. Očekávala jsem tedy, že sekvence budou čitelné jako u odrůdy Onyx. Výsledky sekvenační analýzy odrůdy Orel ukazují na to, že PCR produkty obsahovaly více fragmentů. Při separaci na gelové elektroforóze však fragmenty vypadaly specificky. Je možné, že se u této odrůdy vyskytují různé alely nebo homology vybraných genů a při sekvenování se jejich sekvence překrývají. Řešením by mohlo být zaklonování produktů PCR do bakterií před vlastním sekvenováním.

Alkaloidy mají mnoho společných biosyntetických kroků a meziproductů (Fosssati *et al.*, 2014). Identifikace a charakterizace příbuzných genů podílejících se na syntéze bioaktivních složek je nezbytná pro pochopení molekulárního mechanismu biosyntetických drah (He *et al.*, 2018). V mé práci se zabývám detekcí tří genů. V celé biosyntetické dráze je zapojených mnohem více genů. Též by bylo dobré se věnovat testování optimalizovaných primerů u dalších odrůd máku setého. Vyšším počtem odrůd by se mohla specifikovat různorodost v sekvencích zkoumaných genů. Optimalizované primery by mohly najít využití i v dalších technikách, jejichž základem je PCR reakce např. technika virus-induced gene silencing (VIGS), která je aplikována jako rychlá genetická technika pro analýzu specifických genů (Wijekoon *et Facchini*, 2011). Desgagné-Penix *et Facchini* (2012) uvádí, že prvním krokem této metody je PCR reakce. Mnou optimalizované primery by tedy po dostatečné optimalizaci a testování mohly být použity při této metodě.

7. Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci detekce třech vybraných genů v biosyntetické dráze alkaloidů. Byly vybrány geny *7OMT*, *TNMT* a *CODM*. Každý gen jsem rozdělila na polovinu a navrhla jsem primery samostatně pro každou polovinu genu. Celkem jsem navrhla 13 párů primerů. Primery jsem optimalizovala pomocí PCR reakce a gelové elektroforézy.

Pro sekvenci první poloviny genu *7OMT* se mi podařilo optimalizovat primerový pár AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R3, jimi amplifikovanou sekvenci se mi podařilo úspěšně sekvenovat.

Pro sekvenci druhé poloviny genu *7OMT* se mi podařilo optimalizovat primerový pár AY268893.1 2/2 F1 + AY268893.1 2/2 R1, jimi amplifikovanou sekvenci se mi podařilo úspěšně sekvenovat.

Pro sekvenci první poloviny genu *TNMT* se mi podařilo optimalizovat primerový pár DQ028579.1 1/2 F1 + DQ028579.1 1/2 R1, jimi amplifikovanou sekvenci se mi podařilo úspěšně sekvenovat.

Pro sekvenci druhé poloviny genu *TNMT* se mi podařilo optimalizovat primerový pár AY268893.1 2/2 F1 + AY268893.1 2/2 R1, jimi amplifikovanou sekvenci se mi podařilo úspěšně sekvenovat.

Pro sekvenci první poloviny genu *CODM* se mi podařilo optimalizovat primerový pár GQ500141.1 1/2 F2 + GQ500141.1 1/2 R2, jimi amplifikovanou sekvenci se mi podařilo úspěšně sekvenovat.

Pro sekvenci druhé poloviny genu *CODM* se mi nepodařilo optimalizovat žádný primerový pár.

Tyto primerové páry mohou být použity pro další metody výzkumu a k pochopení jejich funkce. Stejným způsobem se mohou v budoucnu optimalizovat další geny biosyntetické dráhy.

8. Seznam použité literatury a zdrojů

ABEDINI, Davar; MONFARED, Sajad Rashidi; ABBASI, Alireza. The effects of promoter variations of the N-Methylcanadine 1-Hydroxylase (CYP82Y1) gene on the noscapine production in opium poppy. *Scientific reports*, 2018, 8.1: 4973.

Agris, 2019, Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/176677>

Acharya *et* Sharma, 2009, Dostupné z: <http://docsdrive.com/pdfs/sciencepublications/ajidsp/2009/155-160.pdf>

ALAGÖZ, YAĞIZ, *et al.* Identification and sequence analysis of alkaloid biosynthesis genes in Papaver section Oxytona. *Turkish Journal of Biology*, 2016, 40.1: 174-183.

ALCANTARA, Joenel, *et al.* Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant physiology*, 2005, 138.1: 173-183.

BARANYK, P. *et al.* Olejniny. 1. vyd. Praha: *Profi Press*, 2010. 206 s. ISBN 978-80-86726-38-0.

BEAUDOIN, Guillaume AW; FACCHINI, Peter J. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 2014, 240.1: 19-32.

BENSON, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., and Sayers, E.W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46, D41–D47.

BROOK, Karolina; BENNETT, Jessica; DESAI, Sukumar P. The chemical history of morphine: an 8000year journey, from resin to de-novo synthesis. *Journal of anesthesia history*, 2017, 3.2: 50-55.

Český statistický úřad, 2019, Dostupné z: <https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&pvo=ZEM02C&katalog=30840&z=T&f=TABULKA&skupId=346&pvo=ZEM02C>

DANG, Thu-Thuy T.; FACCHINI, Peter J. CYP82Y1 is N-methylcanadine 1-hydroxylase, a key noscapine biosynthetic enzyme in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289.4: 2013-2026.

DELOACHE, William C., *et al.* An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nature chemical biology*, 2015, 11.7: 465.

DESGAGNÉ-PENIX, Isabel, *et al.* Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures. *BMC plant biology*, 2010, 10.1: 252.

DESGAGNÉ-PENIX, Isabel; FACCHINI, Peter J. Systematic silencing of benzyloquinoline alkaloid biosynthetic genes reveals the major route to papaverine in opium poppy. *The Plant Journal*, 2012, 72.2: 331-344.

DU, Guan-Hua. Natural Small Molecule Drugs from Plants. *Springer*, 2018. ISBN 978-981-10-8021-0.

EAGRI, 2016, Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/450178/Olejny_2016.pdf

EAGRI¹, 2018, Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/576447/Olejny_2018.pdf

EAGRI², 2018, Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/596923/Prihlasene_plochy_2018_KOMPLET.pdf

EVANS, William Charles, Daphne EVANS a George Edward TREASE. Trease and Evans pharmacognosy. 16th ed. New York: Saunders/Elsevier, 2009. ISBN 978-0-7020-2933-2.

FACCHINI, Peter J.; DE LUCA, Vincenzo. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, 2008, 54.4: 763-784.

HAGEL, Jillian M., *et al.* Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287.51: 42972-42983.

HAGEL, Jillian M.; FACCHINI, Peter J. Benzyloquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54.5: 647-672.

- HE, Si-Mei, *et al.* Identification and characterization of genes involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis* Species. *Frontiers in plant science*, 2018, 9.
- HAN, Xu, *et al.* The biosynthesis of papaverine proceeds via (S)-reticuline. *Phytochemistry*, 2010, 71.11-12: 1305-1312.
- Hanfmaid, 2019, Dostupné z: <http://handmaid.cf/post/poppies>
- HENRY, Robert J. Molecular markers in plants. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 978-0-47095-951-0.
- CHEN, Xue; DANG, Thu-Thuy T.; FACCHINI, Peter J. Noscapine comes of age. *Phytochemistry*, 2015, 111: 7-13.
- FOSSATI, Elena, *et al.* Reconstitution of a 10 - gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature communications*, 2014, 5: 3283.
- JABLONICKÁ, Veronika, *et al.* Inhibition of phospholipases influences the metabolism of wound-induced benzyloisoquinoline alkaloids in *Papaver somniferum* L. *Journal of plant physiology*, 2018, 223: 1-8.
- KONG, Ling-Lei; WANG, Jin-Hua; DU, Guan-Hua. Morphine. In: Natural Small Molecule Drugs from Plants. *Springer*, Singapore, 2018. p. 295-302.
- LABANCA, Fabiana; OVESNÀ, Jaroslava; MILELLA, Luigi. *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways. *Phytochemistry reviews*, 2018, 1-19.
- LEE, Eun J., *et al.* An assessment of the utility of universal and specific genetic markers for opium poppy identification. *Journal of forensic sciences*, 2010, 55.5: 1202-1208.
- MASÁROVÁ, Veronika; MIHÁLIK, Daniel; KRAIC, Ján. In silico retrieving of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) microsatellites. *Agriculture (Polnohospodárstvo)*, 2015, 61.4: 149-156.
- Ministerstvo zdravotnictví, 2019, Dostupné z: http://www.mzcr.cz/dokumenty/zakon-c-sb_1965_1051_3.html

National Center For Biotechnology Information – NCBI¹, 2019, Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrf1p/>

National Center For Biotechnology Information – NCBI², 2019, Dostupné z: RADP <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrpd/>

NOVÁK, Jan. Jedovaté rostliny kolem nás. *Grada Publishing as*, 2007.

OLD, R. W. a S. B. PRIMROSE. Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering. 5th ed. Boston: Blackwell Scientific, 1994. *Studies in microbiology* (Unnumbered). ISBN 0-632-03712-1.

ONOVWE, Akpevwe, *et al.* Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *The Plant Cell*, 2013, 25.10: 4110-4122.

Phflanzenforschung, 2019, Dostupné z: <https://www.pflanzenforschung.de/de/journal/journalbeitrage/opium-aus-hefe-statt-schlafmohn-bald-koennten-hefen-opi-10304>

SCOSSA, Federico, *et al.* The integration of metabolomics and next-generation sequencing data to elucidate the pathways of natural product metabolism in medicinal plants. *Planta medica*, 2018.

ŞELALE, Hatice, *et al.* Development of EST-SSR markers for diversity and breeding studies in opium poppy. *Plant Breeding*, 2013, 132.3: 344-351.

SHAROPOV, Farukh, *et al.* Alkaloid Content, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Various Parts of *Papaver somniferum*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2018, 52.5: 459-463.

SCHLÄGER, Sabrina; DRÄGER, Birgit. Exploiting plant alkaloids. *Current opinion in biotechnology*, 2016, 37: 155-164.

SORKHEH, Karim, *et al.* In silico search, characterization and validation of new EST-SSR markers in the genus *Prunus*. *BMC research notes*, 2016, 9.1: 336.

SPIJKOVÁ, Jiřina *et al.* Farmakognozie. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.

United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC1, 2018, Dostupné z: https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18_Booklet_3_DRUG_MARKETS.pdf

United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC2, 2018, Dostupné z: https://www.unodc.org/documents/crop-monitoring/Afghanistan/Afghanistan_opium_survey_2018.pdf

United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC3, 2018, Dostupné z: https://www.unodc.org/documents/crop-monitoring/Myanmar/Myanmar_Opium_Survey_2018-web.pdf

VAŠÁK, Jan. Mák. Praha: *Powerprint*, 2010. ISBN 978-80-904011-8-1.

WALKER, John M. a Ralph RAPLEY. *Molecular biology and biotechnology*. 5th ed. Cambridge: *Royal Society of Chemistry*, c2009. ISBN 978-0-85404-125-1.

WEID, Marion; ZIEGLER, Jörg; KUTCHAN, Toni M. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101.38: 13957-13962.

WIJEKOON, Champa P.; FACCHINI, Peter J. Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. *The Plant Journal*, 2012, 69.6: 1052-1063.

WISNIAK, Jaime. Pierre-Jean Robiquet. *Educación química*, 2013, 24: 139-149.

YILMAZ, Güngör, *et al.* Determination of alkaloids and oil rates of some poppy (*papaver somniferum* L.) varieties cultivated as winter and summer. *International Journal of Secondary Metabolite*, 2017, 4.3, Special Issue 2: 359-362.

9. Seznam použitých zkratek

3'OMT = 3'-O-methyltransferase

3OHase = 3'-hydroxylase

4'OMT = (S)-hydroxy-N-methylcoclaurine

4-HPPDC = 4-HPAA decarboxylase

6OMT = (S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase

7OMT = retikuline 7-O-methyltransferase

AT1 = 1,13-dihydroxy-N-methylcandine 13-O-acetyltransferase

BBE = berberine bridge enzyme

CFS = cheilanthifoline synthase

CNMT = (S)-coclaurine N-methyltransferase

CODM = codeine O-demethylase

COR = codeinone reductase

CXE1 = 3-O-acetylpapaveroxine carboxylesterase

CYP82X1 = 1-hydroxy-13-O-acetyl-N-methylcanadine 8-hydroxylase

CYP82X2 = 1-hydroxy-N-methylcanadine 13-O-hydroxylase

CYP82Y1 = N-methylcanadine 1-hydroxylase

DBOX = dihydrobenzophenanthridine oxidase

DeHase = dehydrogenase

DRR = 1,2-dehydroreticuline reductase

DRS = 1,2-dehydroreticuline synthase

LNdeMT = lausanosine N-demethylase

MSH = N-methylstylophine 14hydroxylase

N7OMT = norrecticuline

NCS = norcaclaurine synthase

NMCH = (S)-N-methycoclaurine

NOS = nascapine synthase
P6H = protopine 6-hydroxylase
SalAT = salutaridinol 7-O-acetyltransferase
SalR = salutaridine reductase
SalSyn = salutaridine synthase
SanR = sanguinarine reductase
SOMT1 = scoulerine 9-O-methyltransferase
STOX = (*S*)-Tetrahydroprotoberberine oxidase
StySyn = stylophine synthase
T6ODM = thebaine 6-O-demethylase
TNMT = tetrahydroprotoberberine N-methyltransferase
TYDC = tyrosine decarboxylase
TyrAT = tyrosine aminotransferase

10. Seznam tabulek, obrázků

Graf č. 1: Osevní plocha máku setého v ČR v letech 2002–2018

Graf č. 2: Osevní plocha máku setého v Afghánistánu v letech 1994–2018

Graf č. 3: Osevní plocha máku setého v Myanmaru v letech 1996–2018

Obr. č. 1 Mák setý

Obr. č. 2 Mák setý

Obr. č. 3: Čerstvě naříznutá makovice s latexem

Obr. č. 4: Makovice s uschlým latexem

Obr. č. 5 Biosyntetická dráha vybraných alkaloidů

Obr. č. 6: Sekvence genu *7OMT* s vyznačenými primery

Obr. č. 7: Sekvence genu *TNMT* s vyznačenými primery

Obr. č. 8: Sekvence genu *CODM* s vyznačenými primery

Obr. č. 9: Elektroforeogram fragmentů získaných PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R1

Obr. č. 10: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R2

Obr. č. 11: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R3

Obr. č. 12: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R2

Obr. č. 13: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F1 + AY268893.1 1/2 R3

Obr. č. 14: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R1

Obr. č. 15: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R1

Obr. č. 16: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F3 + AY268893.1 1/2 R2

Obr. č. 17: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 1/2 F2 + AY268893.1 1/2 R3

Obr. č. 18: Sekvence 1/2 genu *7OMT* – odrůda Onyx

Obr. č. 19: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 2/2 F1 + AY268893.1 2/2 R1

Obr. č. 20: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru AY268893.1 2/2 F2 + AY268893.1 2/2 R2

Obr. č. 21: Sekvence 2/2 genu *7OMT* – odrůda Onyx

Obr. č. 22: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 1/2 F1 + DQ028579.1 1/2 R1

Obr. č. 23: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 1/2 F2 + DQ028579.1 1/2 R2

Obr. č. 24: Sekvence 1/2 genu *TNMT* – odrůda Onyx

Obr. č. 25: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 2/2 F1 + DQ028579.1 2/2 R1

Obr. č. 26: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru DQ028579.1 2/2 F2 + DQ028579.1 2/2 R2

Obr. č. 27: Sekvence 2/2 genu *TNMT* – odrůda Onyx

Obr. č. 28: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 1/2 F1 + GQ500141.1 1/2 R1

Obr. č. 29: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 1/2 F2 + GQ500141.1 1/2 R2

Obr. č. 30: Sekvence 1/2 genu *CODM* – odrůda Onyx

Obr. č. 31: Sekvence 1/2 genu *CODM* – odrůda Orel

Obr. č. 32: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F1 + GQ500141.1 2/2 R1

Obr. č. 33: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F2 + GQ500141.1 2/2 R2

Obr. č. 34: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F1 + GQ500141.1 2/2 R2

Obr. č. 35: Elektroforeogram fragmentů získaných gradientovou PCR reakcí při použití primerového páru GQ500141.1 2/2 F2 + GQ500141.1 2/2 R1

Tab. č. 1 Taxonomické zařazení máku setého

Tab. č. 2: Navržené primery pro gen *7OMT*

Tab. č. 3: Navržené primery pro gen *TNMT*

Tab. č. 4: Navržené primery pro gen *CODM*