



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta



BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM
JU ZF ČESKÉ BUDĚJOVICE

Metodika analýzy molekulárních markerů u jilmu, *Ulmus* L.

Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV QI92A247 „Charakterizace genetické struktury autochtonních populací jilmů pomocí DNA analýz, záchrana genofondu a reprodukce *in vitro*“



Autorský kolektiv:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Barbora Kubátová, Ph.D., Ing. Martina
Novotná, Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

České Budějovice, Listopad 2010

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta**

Metodika analýzy molekulárních markerů u jilmu, *Ulmus* L.

Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV QI92A247 „Charakterizace genetické struktury autochtonních populací jilmů pomocí DNA analýz, záchrana genofondu a reprodukce *in vitro*“

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.
Ing. Martina Novotná
Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.
Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.**

České Budějovice, Listopad 2010

Metodika analýzy molekulárních markerů u jilmu, *Ulmus* L.

Vladislav Čurn a kol.

vcurn@seznam.cz

Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

www.zf.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QI92A247 „Charakterizace genetické struktury autochtonních populací jilmů pomocí DNA analýz, záchrana genofondu a reprodukce *in vitro*“.

Text: ©2010 Čurn V., Kubátová B., Novotná M., Máchová P., Cvrčková H.

Foto: ©2010 Čurn V.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN 978-80-7394-252-6

Obsah:

I. Cíl metodiky	1
II. Vlastní popis metodiky	3
II.1. Úvod	3
II.2. Metodika izolace DNA	5
Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA jilmu	5
Metody izolace DNA jilmu	5
<i>Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)</i>	5
<i>Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)</i>	6
<i>Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)</i>	7
<i>Izolace DNA pomocí CTAB a současného přidání PVP (polyvinylpyrrolidon)</i>	9
<i>Izolace DNA pomocí CTAB za současného přidání PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)</i> ...	11
<i>Izolace DNA s použitím CTAB-SDS</i>	12
Porovnání jednotlivých metod izolace DNA	15
II.3. Metodika analýzy DNA markerů	17
RAPD (randomly amplified polymorphic DNA).....	17
SSR (single sequence repeat), mikrosatelity	19
ISSR (inter single sequence repeat)	22
PCR -RFLP analýza ITS	24
AFLP (amplified fragment length polymorphism)	26
II.4. Metodika elektroforézy DNA	29
Elektroforéza v agarózovém gelu	29
Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	33
Elektroforéza v SYNERGELu	35
Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:	36
Separace fragmentů DNA na „čipové“ elektroforéze	36
II.5. Metodika analýzy molekulárních dat	37
Digitální obrazová analýza.....	37
III. Srovnání aktuálnosti postupů	39
IV. Popis uplatnění metodiky	40
V. Seznam použité související literatury	41
VI. Seznam publikací, které předcházely metodice	45
VII. Příklady výstupů analýzy molekulárních markerů	47

I. Cíl metodiky

Na území ČR rostou 3 původní druhy jilmů: V teplejších oblastech roste jilm vaz (*Ulmus laevis* Pall.) a jilm habrolistý (*Ulmus minor* Gled.), v pahorkatině a podhorských krajích jilm horský (*Ulmus glabra* Huds.). Ačkoli mají jilmy v současné době minimální zastoupení v lesních porostech, jsou dřevinami původními a tvoří důležitou složku biocenologické rovnováhy lesních ekosystémů i významný krajinnotvorný prvek jako stromořadí podél cest a zpevňující dřeviny říčních a potočních břehů. Od třicátých let minulého století bylo zastoupení jilmů na našem území silně zredukováno tzv. grafiózou, tracheomykózní chorobou postihující všechny druhy jilmů, jejímž původcem je houba *Ceratocystis ulmi*. Choroba se velmi rychle rozšířila po celé Evropě. Druhá epidemie grafiózy o 40 let později v Evropě zlikvidovala populace jilmů tak, že na mnoha místech zcela vymizely. Situace v České republice není podobně jako ve zbytku evropských zemí příliš dobrá. Na našem území téměř vymizel jilm habrolistý, v hojnějším počtu je zachován jilm vaz a dosud nejpočetněji zastoupeným jilmem je jilm horský. Význam jilmů z hlediska zachování genové diverzity evropských lesů je považován za zcela primární, a proto se této problematice věnují projekty mezinárodního programu EUFORGEN zaměřené na záchranu genových zdrojů evropských jilmů.

Vycházíme-li z faktu, že vývoj přirozené populace závisí na různorodosti genomů jedinců, kteří tuto populaci vytvářejí, pak pouze na základě stanovení genetické diverzity bude možno předpovědět další vývoj zbytkových populací a případně uskutečnit jejich záchranu. Genetickou diverzitu lze pak u lesních dřevin stanovit na základě variability izoenzymů, anebo přesněji analýzou DNA.

Metodiku analýzy molekulárních markerů lze využít především pro charakterizaci genetické struktury autochtonních populací jilmů ve vybraných oblastech ČR a k výběru vhodných genotypů jilmů pro zakládání semenných sadů, klonových archivů či k rozšíření genové banky explantátů. Metodiku bude možné využít i při přípravě modelových postupů řešení pro zachování dalších vzácných a ohrožených druhů lesních dřevin.

II. Vlastní popis metodiky

II.1. Úvod

Již před více než 20 lety, v roce 1988, byla technika DNA fingerprintingu postavená na Southern blot analýze a metodě RFLP poprvé použita pro analýzu rostlinného genomu (Weising et al., 2005). V průběhu několika posledních let se využití molekulárních markerů jeví jako zcela zásadní technika a metodologický přístup ve studiu genetické struktury rostlinných populací a ve studiu geografického paternu genetické variability u rostlin. Dostupné techniky a markerovací systémy umožňují nejen využití tohoto přístupu u stále širšího spektra rostlinných druhů, ale rozšiřuje se i spektrum aplikací molekulárních technik v ekologii a taxonomii – pro účely hodnocení genetické variability v geografickém měřítku rozšíření druhů (Thompson, 1999; Schaal a Olsen, 2000), u studií zaměřených na lokální populace a hodnocení velmi detailní, „jemné“ genetické struktury metapopulací (Manel et al., 2003). Pro hodnocení genetické struktury populací jsou využívány jak isoenzymové markery, tak celá řada DNA technik – (raději bych uvedla ISSR, která je opakovatelná) RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), SSRs (mikrosatelity, *simple sequence repeats*), sekvenování DNA (Coates a Byrne, 2005) a celá škála dalších markerů.

Sledováním genetické diverzity jilmů pomocí stanovení variability izoenzymů se prokázalo, že endemité a málo rozšířené druhy mají nižší genetickou diverzitu než druhy běžně se vyskytující (Hamrick a Godt, 1989). Izolované druhy a populace také vytvářejí méně polymorfních lokusů i nižší počet alel v lokusu (Karron, 1987). Větší pokles genetické diverzity byl rovněž zaznamenán u geograficky izolovaných populací stejného druhu jilmu ve srovnání s ostatními populacemi téhož druhu (Hamrick et al., 1992). Metodou RAPD analýzy byla určována vnitrodruhová diverzita endemitého jilmu v Anglii (Coleman 1998; Coleman et al., 2000). Z genetických markerů se v současné době v zahraničí rozvíjí výzkum mikrosatelitů u populací jilmu vazy (Whiteley et al., 2003) a jilmu habrolistého (Collada et al., 2004). Pozornost byla věnována i ISSR markerům (Goodall-Copestake et al., 2004).

V ČR byla prováděna záchrana původního genofondu jilmů doposud bez znalosti o genetické variabilitě stávajících populací. Poznatky získané pomocí analýzy molekulárních markerů u českých populací jilmů by mohly být využity rovněž pro definování uchovávaných genotypů jilmů v již založených klonových archivech a semenných sadech, pro charakterizaci genetické struktury autochtonních populací jilmů ve vybraných oblastech ČR a k výběru vhodných genotypů jilmů pro rozšíření genové banky explantátů.

II.2. Metodika izolace DNA

Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA jilmu

- explantátové kultury jilmu (kalus a regenerované rostliny z *in vitro* kultury)
- listy odebírané z rostlin z vybraných autochtonních populací
- pupeny odebírané z rostlin z vybraných autochtonních populací

DNA je izolována dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu (odebraného z explantátových kultur nebo ze stromů rostoucích v porostu a ihned zpracovávaného popřípadě uchovávaného do doby izolace na ledu) nebo z materiálu zamraženého (po odebrání je materiál hluboce zmražen a uchováván při teplotě -80°C , krátkodobě je možné uchování i při teplotě -20°C).

Metody izolace DNA jilmu

DNA je izolována z materiálu čerstvého či zamraženého. O výtěžnosti, čistotě a možnostech použití takto získané DNA se zmiňujeme v závěru této kapitoly. DNA je možno izolovat mikroextrakčními metodami (komerčně dostupnými kity) nebo pomocí standardních metod izolace DNA.

Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon – na první koloně dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé koloně dochází k zachycení DNA a jejímu následnému vymytí elučním roztokem.

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogénizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, které můžeme použít je 100 mg.

1. K homogénizovanému vzorku přidáme 400 μl pufru AP1 předeřátého na 65°C a 4 μl RNázy A (100 mg/ml). Důkladně protřepeme na vortexu. Směs inkubujeme 10 min. při 65°C , během inkubace mikrocentrifugační zkumavku 2–3x převrátíme.
2. Přidáme 130 μl pufru AP2, promícháme a inkubujeme 5 min. na ledu. Centrifugujeme 5 min. při 14000 rpm.
3. Lyzát přeneseme do QIAshredder kolonek a centrifugujeme 2 min. při 14000 rpm. Při pipetování lyzátu do kolonek je nutné odstříhnout špičku pipety. Přes filtr projde do sběrné nádoby i malá část mrtvých buněčných pletiv a sraženin, která zde vytvoří pelet.

4. Supernatant přeneseme do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Většinou získáme 450 μ l supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.
5. Přidáme pufr AP3 (s přidaným ethanolem) v množství 1,5 násobku objemu supernatantu a promícháme pomocí pipety. Příklad: 450 μ l supernatantu + 675 μ l pufru AP3.
6. 650 μ l směsi z kroku 5 (včetně sraženin) přeneseme do DNeasy kolonek, centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
7. Opakujeme krok 6 se zbývajícím vzorkem, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky.
8. DNeasy kolonky umístíme do nových centrifugačních zkumavek a přidáme 500 μ l pufru AW. Centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
9. Přidáme 500 μ l pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 2 min. při 14000 rpm až do vysušení membrány v kolonce, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky. DNeasy kolonky opatrně vyndáme z centrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku etanolem obsaženým ve filtrátu.
10. DNeasy kolonky přeneseme do 1,5 ml (2 ml) mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100 μ l pufru AE (zahřátého na 65°C) přímo na membrány kolonek, inkubujeme při pokojové teplotě 5 min. Centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm. Eluci můžeme zopakovat (do nové mikrocentrifugační zkumavky).

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogenizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, které kterého můžeme použít je 100 mg.

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme cca 60 mg rostlinného pletiva. Homogenát přeneseme do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 400 μ l Lysis Buffer P a 20 μ l proteinázy K. Vortexujeme a necháme 30 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace 2 – 3krát promícháme. Připravíme si Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube.

2. Vzorky přeneseme na Spin Filter. Centrifugujeme 10 min. při 12000 rpm. Pokud je to nutné, přidáme 40 μ l Rnázy A (10 mg/ml), vortexujeme a necháme 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
3. Přidáme 200 μ l Binding Buffer P a vortexujeme.
4. Umístíme nové Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube, přeneseme vzorky a 1 min. inkubujeme. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm.
5. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
6. Přidáme 550 μ l Wash Buffer I a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
7. Přidáme 550 μ l Wash Buffer II a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok opakujeme. Nakonec centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm z důvodu potřeby odstranění ethanolu.
8. Spin Filter umístíme do nových 1,5 ml Receiver Tube a přidáme 50 – 100 μ l Elution Buffer D předehřátého na 65°C. Inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidáme 50 μ l Elution Buffer D předehřátého na 65°C a inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm. Postup opakujeme znovu s dalšími 50 μ l Elution Buffer D, ale eluát sbíráme do nové 1,5 ml Receiver Tube. Získáme tak 50 μ l 1. a 2. eluátu.

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami. Vzniklý komplex je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl) a při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x CTAB a 1 % merkptoethanolu, kdy na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku. Připravený roztok dáme předeřhřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, vložíme rostlinné pletivo, ze kterého chceme DNA izolovat (cca 100 mg), do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a drcení usnadníme přidáním sterilního křemičitého písku.
 - Je-li výchozím materiálem pro izolaci lyofilizát, pak tento krok provádíme v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidáváme 5 ml roztoku 2x CTAB a 1 % merkptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l předeřhřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrém. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 500 μ l směsi fenol–chloroform–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě. **tento krok je možné vypustit a nahradit přidáním pouze směsi chloroform-IAA*
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 500 μ l směsi chloroform–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 μ l). 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min. při 4+°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant. Pelet usušíme.
7. Přidáme 300 μ l 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 600 μ l ledového (z mrazáku) 96 % ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant (pipetujeme 2x). Necháme dobře usušit.
10. Přidáme 400 μ l ledového 70 % ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechny supernatant. Vzorky necháme dobře usušit (cca 10 min.).
11. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 μ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 μ l Rnazy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x CTAB extrakční pufr (2 % CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1 % 2-merkptoethanol)
- 2-merkptoethanol
- fenol–chloroform–IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform–IAA (24 : 1)

- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný
- isopropanol
- 70 % ethanol
- RnÁza A 2 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Izolace DNA pomocí CTAB a současného přidání PVP (polyvinylpyrrolidon)

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy. Přidáním PVP (polyvinylpyrrolidon) docílíme odstranění kontaminant a získáme čistou a kvalitnější DNA.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami. Vzniklý komplex je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl) a při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1 % merkaptoethanolu, kdy na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku. Připravený roztok dáme předehřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, vložíme rostlinné pletivo, ze kterého chceme DNA izolovat (cca 100 mg), do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a drcení usnadníme přidáním sterilního křemičitého písku.
 - Je-li výchozím materiálem pro izolaci lyofilizát, pak tento krok provádíme v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidáváme 5 ml roztoku 2x CTAB a 1 % merkaptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l předehřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Po centrifugaci 12000 rpm 10 min. převedeme supernatant (500 μ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 500 μ l chloroformu s IAA, směs 10 min. promícháváme a následně centrifugujeme 5 min. při 12000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5 % CTAB a směs se promícháme, opět přidáme 500 μ l směsi chloroformu–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 μ l) a 2–3x lehce promícháme.

Dáme na 30 min. (až na noc) do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.

7. Přidáme 300 µl 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 2 objemy (600 µl) ledového (z mrazáku) 96 % ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
10. Přidáme 1 ml ledového 70 % ethanolu, 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 µl 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpuštíme 40 min. při 37°C).

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 µl Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2 % CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1 % 2-merkapt ethanol, 1 % PVP–40000)
- 2-merkapt ethanol
- 5 % CTAB
- chloroform–IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- isopropanol
- 70 % ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Izolace DNA pomocí CTAB za současného přidání PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)

1. Připravíme si roztok 2x CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, kdy na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku. Připravený roztok dáme předeřhřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, vložíme rostlinné pletivo, ze kterého chceme DNA izolovat (cca 100 mg), do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a drcení usnadníme přidáním sterilního křemičitého písku.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l předeřhřátého pufru a cca 50 mg PVPP (polyvinylpolypyrrolidon), pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrém. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 500 μ l směsi chloroformu–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 μ l) a 2–3x lehce promícháme. Vložíme na 30 min. do mrazáku (-20°C). V tomto bodě můžeme práci přerušit ponecháním vzorků v mrazáku po dobu až 12 hod. Izolace pokračuje centrifugací vzorků 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant. Pelet usušíme.
6. Přidáme 300 μ l 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
7. Přidáme 20 μ l 3 M octanu sodného a 600 μ l ledového (z mrazáku) absolutního ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Vzorky vložíme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
8. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant (pipetujeme 2x). Necháme dobře usušit.
9. Přidáme 400 μ l ledového 70 % ethanolu a 2–3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechnen supernatant. Vzorky necháme dobře usušit (cca 10 min).
10. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 μ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 μ l Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x CTAB extrakční pufr (2 % CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % 2-merkptoetanol)
- 2-merkptoethanol
- PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)
- chloroform–IAA (24 : 1)

- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný, pH=5,2
- isopropanol
- 70 % ethanol
- RnÁza A 2 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Izolace DNA s použitím CTAB–SDS

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami. Vzniklý komplex je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl) a při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů, jež váže SDS. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

1. Připravíme si roztok Lysis pufru a 1 % 2-merkптоethanolu. Na na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, vložíme rostlinné pletivo, ze kterého chceme DNA izolovat (cca 100 mg), do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a drcení usnadníme přidáním sterilního křemičitého písku.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Přidáme 50 μ l 10 % SDS, zhomogenizujeme a necháme 60 min. inkubovat při 37°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 75 μ l 5M NaCl a promícháme. Přidáme 60 μ l 10 % CTAB a 1 μ l 1 % PVP, promícháme a necháme 30 min. inkubovat při 65°C
5. Po centrifugaci 14000 rpm 10 min. převedeme supernatant (500 μ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 500 μ l chloroformu s IAA, směs necháme 10 min. promíchat a následně centrifugujeme 5 min. při 14000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 5 μ l RNázy A (10 mg/ml) a necháme 30 min. inkubovat při 37°C.
6. Přidáme 0,6 objemu isopropanolu a 2–3x lehce promícháme. Vložíme na 20 min. (až na noc – 12 hod) do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 10 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 1 ml ledového 70 % ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě. Okamžitě odstraníme všechny supernatant, pro odstaranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).

12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 μ l 1x sterilní vodu (rozpuštíme 40 min. při 37°C).

Chemikálie:

- kapalný dusík
- Lysis pufr - extrakční pufr (50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 100 mM EDTA)
- 2-merkaptoethanol
- 10 % SDS
- 5M NaCl
- 10 % CTAB (w/v, v 0,7 M NaCl)
- 1 % PVP (40000)
- chloroform-IAA (24 : 1)
- Isopropanol
- 70 % ethanol
- Rnáza A 10 mg/ml

Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Porovnání jednotlivých metod izolace DNA

Vzhledem ke skutečnosti, že techniky analýzy DNA markerů mají být rutinně používány v běžné praxi pro analýzu genetické struktury vybraných populací jilmu, je potřebné, aby byla k tomuto účelu vypracována vhodná metoda extrakce DNA. Za optimální je považována taková metoda, která bude na straně jedné manuálně i ekonomicky nenáročná a na straně druhé bude poskytovat dostatečný výtěžek DNA. Předpokladem je, že získaná DNA bude použitelná i pro další hodnocení pomocí jiných metod např. metod genetického markerování. Pomocí vybrané „kompromisní“, ale optimalizované metody pak bude možné zpracovat maximální počet vzorků za jednotku času (např. denně, týdně) při uspokojivé kvalitě DNA a za současné ekonomické únosnosti.

Pro volbu vhodné techniky extrakce DNA byly použity dva druhy rostlinného materiálu: 1/ čerstvé pletivo z in vitro podmínek, 2/ zdravé čerstvé listy vzrostlé rostliny. Kromě izolace z čerstvé hmoty byla prováděna i izolace z materiálu zamraženého jednak při teplotě -20°C a jednak -80°C .

V následující tabulce jsou porovnány sledované charakteristiky při hledání optimální metody izolace DNA.

Tab. 1: Porovnání metod izolace DNA.

Metoda	Cena [Kč]	Doba izolace [h]	Počet vzorků na den**	Pracnost ***	Práce s fenolem	Výtěžek roztoku DNA [μl]	Koncentrace roztoku DNA [$\mu\text{g/ml}$]	Výtěžek DNA [ng]
CTAB	10	8 (2dny)*	2 x 24	4	ano ⁺	10 - 200	100-400	2-40
CTAB+PVP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 200	100-400	2-40
CTAB+PVPP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 200	100-400	2-40
CTAB+SDS	12	8	2 x 24	3	ne	10 - 200	100-400	2-40
INVITEK	72	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	5-10	0,05-0,2
QIAGEN	120	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	5-20	0,05-0,2

* osm hodin, ale rozloženo do dvou dnů

** standardní laboratoř, 1 pracovní linka, 1 centrifuga s rotorem pro 24 mikrocentrifugačních zkumavek

*** 1 – nejméně náročné, 5 – nejvíce náročný postup

⁺ lze vypustit, viz. podrobný protokol u příslušné metody izolace

Bylo testováno šest metod extrakce DNA: čtyři klasické metody izolace DNA – izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al., 1992) a pomocí CTAB s přidáním PVP nebo PVPP, pomocí CTAB a SDS (Tigano-Milani et al., 1995); a dvě metody, při nichž byl používán komerčně dodávaný kit pro izolaci rostlinné DNA Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK) a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

Podle sledovaných charakteristik byla jako optimální metoda pro účely analýzy molekulárních markerů vybrána izolace pomocí Plant Mini Kitu (QIAGEN), která i přes vyšší cenu za vzorek nejlépe splňovala sledované vlastnosti. Vysoká cena

byla vyvážena skutečností, že jsou získány standardní vzorky DNA, opakovatelně a reprodukovatelně u celého spektra analyzovaných rostlin. DNA je získána v kvalitě, která následně umožňuje bezproblémovou analýzu širokého spektra DNA markerů. V této metodě jsou spojeny požadavky na jednoduchou standardní a rychlou metodu, kterou bude moci uplatňovat v běžné praxi.

Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN) je cenově nejméně příznivá a ve srovnání s izolací pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu (INVITEK) je i o něco pracnější. Poskytuje však nejvyšší výtěžek DNA o vysoké kvalitě. Tato metoda je vhodná i pro „více problematické“ a cenné vzorky, kde jiné metody izolace nemusejí přinést optimální výsledky. Pro optimalizaci metod analýzy molekulárních markerů a pro účely hodnocení AFLP markerů je ale pro izolaci DNA vhodnější CTAB metoda. U této metody lze modifikovat jednotlivé kroky, je dosahována vyšší výtěžnost a čistota DNA. Metoda ale není vhodná pro velkosériové izolace a pro případy jednoduchých screeningových analýz. Všechny tři metody izolace založené na použití CTAB (metoda CTAB, metoda CTAB-PVP a metoda CTAB-PVPP) mají stejné parametry při základním porovnání (pracnost, množství izolované DNA). Odlišnost nalezneme zejména v kvalitě a čistotě DNA a ve spolehlivosti izolace. Tyto dva poslední parametry se projevily u náročnějších technik, jako je AFLP analýza. U méně náročných technik analýzy molekulárních markerů (analýza ITS, mikrosatelity) poskytují vyhovující a srovnatelné výsledky všechny výše zmiňované metody izolace DNA.

Při srovnání izolace DNA z listů odebíraných ze stromů v porostu a *in vitro* podmínek nebyly shledány rozdíly v případě, že DNA je izolována ze zdravých mladých listů. Izolace DNA z pupenů či starých listů neposkytuje DNA použitelnou pro další analýzy.

II.3. Metodika analýzy DNA markerů

RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)

RAPD analýza je metoda založená na PCR technologii. Mezi její výhody patří rychlost (je použitelná pro rychlý screening a identifikaci vzorků) a potřeba jen velmi malého množství templátové DNA. Při RAPD analýze jsou využívány náhodně generované primery, a proto není pro její provedení vyžadována znalost cílových sekvencí a studovaného genomu. RAPD detekuje polymorfismus v celém genomu (Oborník et al., 2000). Chakrabarti et al. (2006) upozorňuje na jednu z hlavních nevýhod této metody, a tou je nestabilita poskytnutých spekter v rámci opakování a dále pak rozdíly ve spektrech v závislosti na izolovaném pletivu a podmínkách kultivace.

Pro RAPD analýzu u jilmu byly pro účely předkládané metodiky použity náhodné primery (OPERON Technologies, CA), sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Sekvence náhodných primerů používaných pro RAPD analýzu.

Primer	Sekvence '5—3'
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-20	GTTGCGATCC
OPB-01	GTTTCGCTCC
OPB-03	CATCCCCCTG
OPB-04	GGACTGGAGT
OPB-06	TGCTCTGCCC
OPB-07	GGTGACGCAG
OPB-08	GTCCACACGG
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-12	CCTTGACGCA
OPB-17	AGGGAACGAG
OPB-18	CCACAGCAGT
OPB-20	GGACCCTTAC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-05	CCGAATTCCC
OPF-07	CCGATATCCC
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-12	ACGGTACCAG

Sekvence dalších primerů Operon lze nalézt v databázi výrobce:

https://www.operon.com/stock/rapd_10mer_price.php

Protokol RAPD analýzy vychází z metodiky Williams et al. (1990) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Sobotka et al. (2004) a Čurn et al. (2005).

PCR reakce probíhá v objemu 25 μ l, v 1x reakčním pufru (10 mM Tris-HCl, pH=8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100), 100 μ M dNTP, 10 pM primeru (Operon Technologies, serie A, B, F, H a K), 1 U Taq polymerázy (TAKARA) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém TAKARA:

- 2,5 μ l 10x reakčního pufru
- 2,0 μ l dNTPs
- 1 μ l DNA
- 2 μ l primeru
- 0,2 μ l DNA polymerázy (1 U)
- 17,3 μ l dH₂O (voda do objemu 25 μ l)

Alternativně je možné použít komerčně dodávané „master mixy“. PCR reakce pak probíhá v objemu 25 μ l, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl₂), 200 μ M dNTP, 10 pM primeru (Operon Technologies, serie A, B, F, H a K), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 μ l PPP master mixu
- 1 μ l DNA
- 2 μ l primeru
- 9,5 μ l dH₂O (voda do objemu 25 μ l)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 3 min. | 94°C |
| • 45 cyklů: | 1 min. | 94°C |
| | 2 min | 35°C |
| | 3 min | 72°C |
| • konečná elongace | 10 min | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

PCR produkty se rozdělují na 1,5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. RAPD profily se zaznamenávají za využití Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

RAPD fingerprinty se následně vyhodnocují specializovaným softwarem (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager for Windows, BioSystematica; UltraQuant) a získaná primární data přítomnosti či nepřítomnosti daného markeru se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl₂ nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

SSR (single sequence repeat), mikrosatelity

Za mikrosatelity se považují tandemově uspořádaná krátká opakování s délkou motivu 2–4 párů bazí (Morgante and Olivieri, 1993). Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50 ti kopiích.

Mikrosatelity jsou u jilmu používány pro studium genetické diverzity a struktury autochtonních populací (Whiteley et al., 2003; Collada et al., 2004), pro studium míry hybridizace a genetické eroze v případě kontaktu autochtonních a invazních druhů (Zalapa et al., 2008) a studium toku genů (gene flow) v kontaktních zónách původních a invazních druhů (Zalapa et al., 2009).

Pro SSR analýzu byly za účelem optimalizace metodiky použity primerové páry uvedené v tabulce 3.

Tab. 3: Sekvence primerů používaných pro SSR analýzu.

Primer	Sekvence '5—3'
Ulm2F	GCGTCTCAGAACAACAGCTTCA
Ulm2R	GGCTGCAAGATTGAACTTGAT
Ulm3F	TCCTGTTTCAGAGACATGCA
Ulm3R	GGACCATCTCTTCGCTGTTGT
Ulm6F	CCTTCATGATTGCAATCGGTA
Ulm6R	ACAATAATCGTAACCATCTT
Ulm9F	GCATGAGCTTATTCGTTATAC
Ulm9R	GGCAAAGAAATCAGTATTAGGA
Ulm12F	CGTGGACTAACAGCAAACATT
Ulm12R	AGTGCACCCGCGCACTCA
Ulm19F	ACAAGCATCCTTTATACACAC
Ulm19R	TCTATCTCTCTTCAATTTCTG
Ulm8F	GCATAGATGGAGATTGGGAT
Ulm8R	GCCTCAAACACAATCCCACCT

Ulmi1-21F	GCGGTCTTACGTGAGCTTTC
Ulmi1-21R	AAAGAGGCAGACGAAGATGG
Ulmi1-98F	AAATGGCCGGAATGTGTTAC
Ulmi1-98R	TGGGTGAGAGGACAAGTGAA
Ulmi1-165F	CTCTTCCATTCGTCCTCACC
Ulmi1-165R	GAGGTGCCATAAGCCAAGAA
UR101F	GGGAAGTCAAATTCCTATGA
UR101R	CTCCAATGGCATCTTCACAA
UR123F	AGCAATAAACCTTGTGTCGTG
UR123R	GAGCTTGCTATGCTTCGTCTC
UR138F	CTAGAACCCCTTCGAAACC
UR138R	ACAAAAAGCCCACACACCTC
UR141F	TTGTGTTTGCGTGAAAAGGA
UR141R	GTTCCATGGGTTTTTCATTGG
UR153F	AGATTTTCATGCCTCCAGTCG
UR153R	CCTTTCGAAATGCAGAGGTAG
UR158F	TTCTTCATAGGCGCTGAGGT
UR158R	TGCACCCTGTCAAAGCTAAA
UR159F	TGCATGAACATGGACTTCATT
UR159R	TGATGTTAAGATAAGAAGTCATTAGGA
UR173aF	ATAAAGGACGCTAAGGCAGTCA
UR173aR	AGACAAACTCTTCGCCATCAAT
UR173bF	CCGTGCAACTTTCCTGCTAC
UR173bR	TGACTGCCTTAGCGTCCTTTAT
UR175F	TGCCAATTTGTTGAAATTTACG
UR175R	TTGTTGGTTGTGGTTTGTGA
UR188aF	AAAATAACGCGTCCCTTCC
UR188aR	ATTTTCGCTTCAATTGCGAGT

Protokol SSR analýzy vychází z metodiky Williams et al. (1990) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Nováková et al. (2008).

PCR reakce probíhá v objemu 10 μ l, v 1x reakčním pufu (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 5 μ l Plain PP Master Mix s MgCl_2
- 2 μ l DNA
- 0,05 μ l primer F (FAM)
- 0,05 μ l primer R
- 0,1 μ l BSA
- 2,8 μ l dH_2O (voda do objemu 10 μ l)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min. 94°C
- 30 cyklů:
 - 15 s 94°C
 - 90 s 50–60°C, dle příslušného primeru
 - 120 s 72°C
- konečná elongace 20 min 72°C
- stop – 4°C

nebo

- počáteční denaturace 4 min. 94°C
- 2 cykly:
 - 45 s 94°C
 - 45 s 60°C
 - 45 s 72°C
- 18 touchdown cyklů:
 - 45 s 94°C
 - 45 s 59°C (snížení o 0,5°C na cyklus)
 - 45 s 72°C
- 20 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 50°C
 - 45 s 72°C
- konečná elongace 20 min. 72°C
- stop – 4°C

nebo

- počáteční denaturace 4 min. 94°C
- 4 touchdown cykly:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 63°C (snížení o 1°C na cyklus)
 - 30 s 72°C
- 27 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 59°C
 - 30 s 72°C
- konečná elongace 20 min. 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se detekují po fragmentační analýze na genetickém analyzátoru.

- Příprava vzorků pro fragmentační analýzu
 - Formamid..... 11 µl
 - LIZ500 Size Standard 0,4 µl
 11 µl směsi standardu s formamidem smícháme s 1 µl PCR produktu, vzorky inkubujeme 4 minuty při teplotě 94 °C a následně rychle zchladíme na teplotu 4°C

Profily SSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného software (GeneMapper v4.1) a primární data se dále statisticky zpracovávají (MVSP, DARwin, Structure).

Chemikálie:

- Plain PP Master Mix s MgCl₂ (Top-Bio)
- BSA 10 mg/ml (NEB)
- templátová DNA
- primery
- formamid
- LIZ 500 Size Standard (Applied Biosystems)
- forward primer značen 6-FAM fluorescenčním barvivem
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák
- genetický analyzátor pro separaci markerů

ISSR (inter single sequence repeat)

Technika ISSR markerů je modifikací techniky SSR markerů (Zietkiewics et al., 1994; Kantety et al., 1995). Tato technika je založena na použití PCR amplifikace s náhodně ukotveným mikrosatelitovým motivem. Na rozdíl od techniky SSR není při ISSR nutná žádná předchozí znalost sekvence. Hantula et al. (1996), Charters et al. (1996) a Zietkiewics et al. (1994) považují tuto metodu v porovnání s metodou RAPD za přesnější a opakovatelnější. Metoda ISSR markerů zároveň poskytuje větší polymorfismus. ISSR markery jsou dominantní, ačkoli někteří autoři udávají i jejich kodominantní charakter (Fischer et al., 1996). ISSR markery u jilmu používal např. Goodall-Copestake et al. (2004).

Tab. 4: Sekvence primerů používaných pro ISSR analýzu.

Primer	Sekvence '5—3'	Teplota nasedání
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	48°C
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	56°C
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	55°C
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	51°C
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	52°C

Protokol ISSR analýzy vychází z metodiky Prevost and Wilkinson (1999) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Nováková et al. (2008).

PCR reakce probíhá v objemu 25 μ l, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 5 μ l Plain PP Master Mix s MgCl_2
- 1 μ l DNA
- 0,25 μ l UBC primer
- 0,2 μ l BSA
- 3,55 μ l dH_2O (voda do objemu 10 μ l)

- Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

• počáteční denaturace	2 min.	95°C	
• 40 cyklů:	20 s	93°C	
	60 s	48°C	* resp. příslušná T_{ann}
	20 s	72°C	
• konečná elongace	6 min	72°C	
• stop	–	4°C	

PCR produkty se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. ISSR profily se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

Profily ISSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager for Windows, BioSystematica; UltraQuant) a primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- Plain PP Master Mix s MgCl_2 (Top-Bio)
- BSA 10 mg/ml (NEB)
- templátová DNA
- primery
- dH_2O (PCR dH_2O , nebo Millipore dH_2O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

PCR -RFLP analýza ITS

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci ITS regionu a následném štěpení amplifikovaného produktu. Volbou primerů je možno amplifikovat úsek ITS1, ITS2 nebo celý region zahrnující ITS1+ITS2 a 5,8S rDNA. ITS představují mezerníky mezi geny pro rRNA a oproti kodujícím sekvencím jsou více variabilní. Jejich délkového a sekvenčního polymorfismu se využívá při analýze pomocí metody PCR-RFLP a analýza ITS může poskytnout data pro konstrukci fylogenetických stromů, data pro identifikaci hub a hodnocení homogenity souboru kmenů.

Metoda se skládá ze dvou částí:

I. Amplifikace specifického fragmentu z ITS regionu.

II. Štěpení příslušného fragmentu pomocí specifických restrikních endonukleáz.

I. Protokol ITS-RFLP analýzy je modifikací metodiky z práce Gardes a Bruns (1996) a Endrychová (2004). Pro účely PCR-RFLP analýzy byly použity univerzální primery ITS1 a ITS4, resp. ITS5 a ITS4.

Tab. 4: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci ITS regionu.

Primer	Sekvence '5—3'
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTGGTAACAAGG
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

White et al (1990)

PCR reakce probíhá v objemu 25 μ l, v 1x reakčním pufu (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 μ l Plain PP master mixu
- 1 μ l DNA
- 0,25 μ l primer ITS5 nebo ITS1
- 0,25 μ l primer ITS4
- 11 μ l dH_2O (voda do objemu 25 μ l)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

Pro primerový pár ITS1 a ITS4, ITS5 a ITS4:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 2 min | 94°C |
| • 35 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 3 min | 62°C |
| | 1 min | 72°C |
| • konečná elongace | 10 min | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

II. Po ukončení PCR se část objemu reakční směsi použije pro RFLP analýzu. K této části PCR reakce je přidán pufr pro příslušnou restriční endonukleázu, 5 U restričního enzymu, BSA (zlepšuje provedení restričního štěpení, množství je nutno optimalizovat dle restriktázy a použitého RE pufru, 1 μ l je vhodný u restriktáz NEB) a probíhá štěpení amplifikovaného fragmentu. Štěpení amplifikovaných fragmentů DNA je možno provádět pomocí různých restričních endonukleáz (*AluI*, *HaeI*, *MboI*, *HinfI* a *HhaI*).

Příprava reakce pro restriční analýzu:

- 15 μ l PCR reakční směsi
- 2 μ l 10x RE reaction buffer (pufr dodávaný společně s RE)
- 0,5-1 μ l restriční endonukleázy (\approx 5 U)
- \pm 1 μ l 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)
- voda do celkového objemu 20 μ l

Štěpení probíhá při teplotě 37°C po dobu 6-7 hodin v termostatu nebo lépe v termocykleru. Produkty (naštěpené fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Kvalitnějšího rozdělení je dosaženo na 3 % Synergelu nebo 10 % PAGE v TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Na gel je nanášeno 10 μ l neštěpených produktů a celý objem (20 μ l) štěpených fragmentů. Fingerpriny se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System. Fingerpriny se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; UltraQuant, UltraLum) a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

pro PCR analýzu

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl₂ nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

pro RFLP analýzu

- PCR reakce
- restriční endonukleáza
- pufr pro restriční endonukleázu
- 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, termostat

AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Technika AFLP kombinuje principy technik RFLP a PCR (Vos et al., 1995). Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí současně dvěma restričními endonukleázami. Na vzniklou populaci restričních fragmentů se ligují adaptory o známe sekvenci a provádí se preselektivní amplifikace. Primery pro tento amplifikační krok jsou komplementární k adaptorům s dalším selektivním nukleotidem na 3'– konci. Selektivní amplifikace se pak provádí s primery opatřenými třemi selektivními nukleotidy (v případě rostlin resp. objektů s velkým genomem). U AFLP dochází ke kombinaci specifčnosti restričního štěpení se snadností PCR. Polymorfismus se pak zjišťuje na základě přítomnosti/nepřítomnosti a velikosti amplifikovaných fragmentů po separaci na PAGE nebo na genetickém analyzátoru (sekvenátoru).

Oproti metodám RFLP a RAPD má technika AFLP řadu výhod, přičemž mezi nejdůležitější patří generování velkého množství dominantních markerů pokrývajících celý genom. Kromě využití pro identifikaci genotypů kulturních rostlin je cílena zejména pro účely mapování významných kvalitativních a kvantitativních znaků. Tato metoda nachází uplatnění také při studiu biodiverzity, přípravě markerů a genetickém mapování (Ballvora et al., 1995; Boucias et al., 2000a; 2000b; Suwannakut et al., 2005).

Restrikce genomické DNA a ligace adaptorů (restričně ligační krok):

Restrikce (50 µl celkový objem):

40 µl vzorku DNA + 1x R/L pufr, 5 U *EcoRI*, 5 U *MseI*

Na 1 vzorek:

4,25 µl H₂O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *MseI* = 5 U

(10 µl restričního master mixu se přidá ke 40 µl templátu DNA, promíchá se a štěpí se 16 h při 37°C)

Ligace (60 µl celkový objem):

50 µl restrikční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol EcoRI 3' adaptor, 5 pmol EcoRI 5' adaptor, 50 pmol MseI 3' adaptor, 50 pmol MseI 5' adaptor, 1,2 pmol ATP, 1 U T4 DNA ligáza

Na 1 vzorek: 1 µl 10x RL pufru, 0,1 µl EcoRI–3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 µl EcoRI–5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 µl Mse–3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 µl Mse–5' adaptoru = 50 pmol, 1,2 µl 10 mM ATP, 1 µl (1 U) T4 Ligase, 6,2 µl vody
(10 µl ligačního master mixu se přidá k 50 µl restrikční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37°C)

R/L směs se po ukončení ligace naředí 10x T0.1E puftrem (540 µl T0.1E pufru + 60 µl R/L směsi)

Pre-selektivní amplifikace (+1/+1) PCR

Preselektivní amplifikace (50 µl celkový objem):

5 µl vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 75 ng EcoRI–A primeru, 75 ng MseI–A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 5 µl vzorku, 5 µl PCR pufru, 2 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP's, 0,15 µl EcoRI–A primeru (500 ng/µl), 0,15 µl MseI–A primeru (500 ng/µl), 0,2 µl Taq (5 U/µl), 36,5 µl vody
(45 µl PCR master mixu se přidá k 5 µl vzorku)

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 30 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 60°C
 - 1 min 72°C
- konečná elongace 9 min 72°C
- stop – 4°C

Po ukončení preselektivní amplifikace se 40 µl reakční směsi 20 x naředí (760 µl TE + 40 µl templátu).

10 µl nenaředěného PCR produktu se použije na elektroforézu (1,2 % agarózový gel v 1x TBE/TAE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 0 – 400 bp.

Selektivní amplifikace (+3/+3) PCR

Selektivní amplifikace (10 µl celkový objem):

2,5 µl vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 5 ng EcoRI–ANN–FAM primeru, 30 ng MseI–ANN primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 2,5 µl vzorku, 1 µl PCR pufru, 0,2 µl 10 mM dNTP's, 0,087 µl EcoRI–ANN–FAM primeru (10000 pmol), 0,095 µl MseI–ANN primeru (316 ng/µl), 0,1 µl Taq (5 U/µl), 6,018 µl vody (7,5 µl PCR master mixu se přidá k 2,5 µl vzorku).

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů: 30 s 94°C
30 s 65°C (-1°C/cyklus)
1 min 72°C
- 25 cyklů: 30 s 94°C
30 s 56°C
1 min 72°C
- konečná elongace 15 min 72°C
- stop – 4°C

Příprava vzorků na fragmentační analýzu:

Vzorky jsou připraveny do 96 jamkových destiček (ABI):

11 µl formamidu, 0,4 µl 400 HD Rox Size Standard nebo 500 LIZ Size Standard (ABI), 1,0 µl vzorku (po selektivní amplifikaci)

Vzorky se důkladně promíchají, musí být bez bublinek a jsou v cyklu denaturovány – 4 min. při 95°C. Ihned (!) po ukončení denaturace jsou vloženy na nejméně 2 min. do cold bloku vychlazeného na -20°C, po té je provedena fragmentační analýza (ABI – automatický genetický analyzátor – sekvenátor) dle manuálu k sekvenátoru.

Chemikálie:

- 10x RL pufr (10 ml zásobní roztok): 0,121 g Tris–acetate do 8 ml H₂O (100 mM); upravit pH na 7,5 pomocí led. kys. octové; přidat 0,214 g MgAc (octan hořečnatý) (100 mM); 0,491 g KAc (octan draselný) (500 mM); 0,077 g Dithiothreitol (DTT) (50 mM)
- ATP (10 mM, 100 µl alikvoty, uchovávat v -80°C): 0,06 g ATP do 8 ml H₂O; upravit pH na 7,0 pomocí 0,1 N NaOH; doplnit do 10 ml
- T0.1E pufr: 5 ml 1 M Tris pH=7,5 (8,0), 100 µl 0,5 M EDTA, doplnit vodou do 500 ml
- Hi-Di formamid (ABI)
- 400 HD Rox Size Standard nebo 500 Liz Size Standard (ABI)
- templátová DNA
- restriční enzymy (*MseI*, *EcoRI* – NEB)
- Mse a Eco adaptory, Mse a Eco preselektivní primery, Eco fluorescenčně značené selektivní primery, Mse selektivní primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, mrazicí destička, genetický analyzátor

II.4. Metodika elektroforézy DNA

Klasickou metodou, univerzálně používanou k rozdělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporné elektrody směrem ke kladné. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. Fragmenty o stejné délce v gelu postupují stejně rychle a vytvoří proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se uvnitř dvoušroubovice a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, jsou gely po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě.

Elektroforéza v agarózovém gelu

Příprava gelu:

1. Agaróza se smíchá s vodou a pufrem v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozvaří se v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max výkon, nesmí zpěnit); agaróza musí být dokonale rozpuštěná, během rozváření je nutné s Erlenmayerovou baňkou několikrát zamíchat.
2. Roztok agarózy je třeba zchladit na cca 55°C, přidá se odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promíchá a nalije se do připravené vaničky, ve které je umístěn hřebínek; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu je nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny je zapotřebí eliminovat.
3. Agarózový gel se nechá 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je umístěn do elektroforetické vany a pod hladinu pufru jsou do jamek vkládány vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky se naplní dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25 µl) se přidá 4 µl nanášecího pufru (LB), promíchá se špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně je možné nanést vzorky na gel a poté opatrně vložit gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25 % bromfenolové modři, 40 % (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpípetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 2 µl markeru, 6 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 40 V po dobu 20 min. a poté 80 V po dobu cca 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- gel je položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotografováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

Tab. 5a: Složení 0,7 % agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 0,7 % agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [µl]
50	0,35	49	1	5
100	0,7	98	2	8
150	1,05	147	3	8-10
200	1,4	196	4	12-13

Tab. 5b: Složení 0,7 % agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 0,7 % agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [µl]
50	0,35	40	10	5
100	0,7	80	20	8
150	1,05	120	30	8-10
200	1,4	160	40	12-13

Tab. 6a: Složení 1,5 % agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 1,5 % agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	0,75	49	1	5
100	1,5	98	2	8
150	2,25	147	3	8-10
200	3	196	4	12-13

Tab. 6b: Složení 1,5 % agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 1,5 % agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	0,75	40	10	5
100	1,5	80	20	8
150	2,25	120	30	8-10
200	3	160	40	12-13

Tab. 7a: Složení 3,0 % agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 3 % agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	1,5	49	1	5
100	3	98	2	8
150	4,5	147	3	8-10
200	6	196	4	12-13

Tab. 7b: Složení 3,0 % agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 3 % agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	1,5	40	10	5
100	3	80	20	8
150	4,5	120	30	8-10
200	6	160	40	12-13

Tab. 8: Příprava pracovních roztoků TAE a TBE pufrů.

1x pufr TAE/TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 9: Složení zásobních roztoků TAE a TBE pufrů

	50x TAE	5x TBE
Tris (Trizma)	242 g	54
0,5 M EDTA	100 ml	20 ml
led. kys. octová	57,1 ml	-
kys. boritá	-	27,5
dH ₂ O	voda do 1 L	voda do 1 L

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TAE/TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Příprava gelu:

1. Důkladně umyjeme elektroforetická skla (ve vodě a poté je otřeme ethanolem), sestavíme aparaturu do „nalévacího stojánku“.
2. Ze zásobních roztoků připravíme směs – AC/BIS + voda + gelový pufr + siřičitan sodný, promícháme a přidáme persíran amonný a TEMED, důkladně promícháme, ale vyvarujeme se tvorby bublin v roztoku! a IHNED!!! nalijeme nebo 10 ml automatickou pipetou nanese mezi sestavená skla; roztok může i velmi rychle „tuhnout“; vložíme hřebínek a necháme min 1 hod. polymerovat.
3. Poté vyjmeme hřebínek, jamky propláchneme elektroforetickým pufrem, nanese vzorky a sestavíme komplet elektroforézy.
4. Nalijeme elektroforetické pufrы a probíhá elektroforéza.
5. Po ukončení elektroforézy opatrně oddělíme skla, vyjmeme gel a přeneseme jej do barvicí směsi (200 ml elektroforetického pufru a 20 μ l roztoku ethidium bromidu); barvení probíhá 10–30 min. a poté jsou fragmenty vizualizovány na UV transiluminátoru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25 % bromfenolové modři, 40 % (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpípetuje do mikrocetrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 2 μ l markeru, 6 μ l vody, 2 μ l LB se promíchá a nanese na gel
-

Podmínky separace:

- 50 V po dobu 30 min. a poté 220 V po dobu 2,5 – 3 hod.

Vizualizace DNA:

- po obarvení je gel položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotografováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

akrylamid je neurotoxický a kancerogenní, při práci s roztoky a gely je třeba dbát zvýšené opatrnosti a používat ochranné pomůcky! Zvláštní opatrnosti je třeba zejména při přípravě zásobních roztoků (práce s rouškou v digestoři)

Tab. 10: Složení nedenaturačního gelu pro elektroforézu DNA.

		nedenaturační gel	
		SEPARAČNÍ GEL (7.5 %)	SEPARAČNÍ GEL (10 %)
redestilovaná	ml	37,5	31,5
voda	ml	15	20
AC/BIS	ml	7,5	7,5
pufr A nebo A'	μl	160	160
siřičitan sodný	μl	300	300
persíran amonný	μl	30	30
TEMED			
AC/BIS:		30 g acrylamid + 0,8 g BIS / 100 ml	
pufr A:		7,27 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH=7,5 / 100 ml	
pufr A':		36,3 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH=8,8 / 100 ml	
pufr B:		6 g Tris, 48 ml 1 M HCl, pH=6,8 / 100 ml	
Na₂SO₃ :		nasycený vodný roztok	
(NH₄)₂S₂O₈:		15 % roztok	
SDS:		10 % roztok	
elektrodový pufr 1:		9,27 g kys. boritá, NaOH do pH=7,2 / 1000 ml	

AC/BIS	uchovávat ve tmě a chladnu, roztok stálý cca 3 týdny
gelové pufr	uchovávat ve tmě a chladnu, stálé
persíran	lze uchovávat ve tmě a chladnu 1 týden
elektrodový pufr 1	připravovat před použitím

Chemikálie:

- redestilovaná nebo deionizovaná („millipore“) voda
- akrylamid a bis-akrylamid (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- roztoky pufrů
- nasycený vodný roztok siřičitanu sodného
- persíran amoný
- TEMED
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- jednotka vertikální elektroforézy se zdrojem, sada pro nalévání gelů, sada automatických pipet

Alternativním postupem pro DNA PAGE je využití čipové elektroforézy Experion (Bio-Rad) s čipy pro elektroforézu DNA. Postup je velmi rychlý, dostatečně citlivý a precizní, nevýhodou je nutnost pořízení nákladné investice.

Elektroforéza v SYNERGELu

Synergel je přípravek, který po smíchání s agarózou vytváří gel a výrazně zvyšuje separační možnosti agarózového gelu. Separované fragmenty DNA vytváří ostré pruhy, dobře rozdělené. Je používán zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE gelu je zachována jednoduchost přípravy a provedení gelu a jeho netoxičnost.

Výpočet množství synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci synergelu vypočítáme na základě následujícího vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

kde A je koncentrace agarózového gelu bez přídavku synergelu, který chceme převést na synergel/agarózový gel

0,7 – je hodnota koncentrace základního agarózového gelu

např. v případě, kdy standardní 3 % agarózový gel nahrazujeme gelem s přídavkem synergelu je složení gelu následující:

$$A = 3 \%$$

množství synergelu ve směsi: $(3 - 0,7) / 2 = 1,15 \%$
1,15 % synergelu přidáme k 0,7 % agarózy, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g synergelu a 1,75 g agarózy

Postup přípravy Synergel/agarózového gelu:

- Navážíme daná množství agarózy a synergelu.
- Přidáme takové množství 96 % ethanolu, aby došlo k rozmíchání (nesmí se tvořit hrudky).
 - Přidáme 250 ml 0,5x TBE pufru.
 - Rozvaříme v mikrovlnné troubě.
 - Přidáme 5 μ l roztoku ethidium bromidu.
 - Důkladně promícháme.
 - Nalijeme do vany / formy na gel.
 - Necháme ztuhnout – cca 1–1,5 hod.

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- Synergel (Roth)
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:

V případě použití barviva SYBR GREEN (nižší toxicita, lepší vizualizace DNA na gelu, nižší pozadí) se při přípravě gelu nepoužívá ethidium bromid. Po ukončení PCR je ke vzorkům DNA přidán nanášecí pufr (LB) se SYBR GREEN. Vzorky jsou nanášeny na gel a probíhá elektroforéza. Po ukončení elektroforézy probíhá vizualizace DNA fragmentů/PCR produktů na UV transiluminátoru. V případě dokumentace gelů pomocí kamery nebo fotoaparátu je nutné použití zeleného filtru namísto červeného filtru používaného u gelů barvených ethidium bromidem !

LB se SYBR GREEN: 0,025 g Bromphenol Blue
 0,025 g Xylene Cyanol FF
 3 ml glycerol
 20 μ l SYBR GREEN (koncentrovaný roztok, FLUKA)
 doplnit dH₂O do 10 ml

rozpipetovat do alikvot a skladovat v temnu při -20°C, krátkodobě lze skladovat i při +4°C

Separace fragmentů DNA na „čipové“ elektroforéze

Analýza amplifikovaných, resp. restrikčních fragmentů DNA byla provedena na systému automatické čipové elektroforézy Experion (Bio-Rad, USA), která pracuje na principu mikrofluidní technologie, kdy se celá analýza odehrává v miniaturním prostředí speciálního čipu. Vlastní separace a detekce fragmentů DNA probíhá ve speciálních čipech založených na kombinaci mikrofluidní technologie LabChip (Caliper Life Sciences') a citlivé fluorescentní detekce. Pro analýzu DNA se používá analytický kit Experion DNA 1K/12K Analysis Kit, který obsahuje DNA standard (1k nebo 12k Ladder), vzorkový pufr (sample buffer), gelový roztok, fluorescenční barvu, centrifugační filtry a mikrofluidní čipy; každý čip pojme 11 vzorků. Příprava vzorku pro analýzu spočívá ve smíchání 1 μ l vzorku a 5 μ l vzorkového pufru. Na čipy, do kterých jsou před vlastní analýzou zavedeny gelové roztoky pomocí přístroje "priming station" (dodávaného jako součást systému), jsou vzorky aplikovány v množství 6 μ l po výše uvedené úpravě. Vlastní analýza na přístroji Experion a zpracování získaných dat je prováděno pomocí speciálního software Experion, version 2.1 (Bio-Rad, USA).

II.5. Metodika analýzy molekulárních dat

Digitální obrazová analýza

Vyhodnocování získaných elektroforeogramů:

Pro vyhodnocení výsledků po elektroforéze - tj. spekter molekulárních markerů je používána řada metod. Mezi jednodušší metody vhodné při malém množství analyzovaných vzorků a malém počtu proužků je ruční proměření gelů a stanovení relativní pohyblivosti jednotlivých pruhů nebo po srovnání s velikostním markerem, stanovení jejich velikosti (délky udané v pb).

Poměrně dokonalých výsledků lze dosáhnout po důkladnější (ale značně časově náročné) obrazové analýze gelů. K tomuto účelu jsou dostupné komerčně dodávané záznamové jednotky (scanery, příp. zařízení na bázi CCD kamery, s obslužným a vyhodnocovacím softwarem - BioRad, Image Laboratory, Stratagene), ale výsledků obdobné kvality lze dosáhnout i s méně finančně náročným zařízením.

Na našem pracovišti využíváme komplexní počítačové zpracování gelů - při využití barevného stolního scanneru s vysokou rozlišovací schopností (min 600 dpi) nebo digitálního fotoaparátu jako součásti GelDocumentation System. Po digitalizaci jsou gely zpracovány pomocí speciálního software - GelManager® for Windows (BioSystematica, U.K.), BioProfil 1D++ (Vilber Lourmat, Francie) nebo UltraQuant 6.0 (UltraLum, Inc., USA).

Tyto programy pro digitální obrazovou analýzu a zpracování elektroforetických gelů umožní analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňují konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány. Využití mají zejména v epidemiologických studiích, identifikaci genotypů, systematice, ekologii, populační genetice, klinické biochemii a biotechnologických aplikacích.

Postup obrazové analýzy gelů:

Následující kroky představují kostru postupu počítačového zpracování a vyhodnocování elektroforeogramů

- záznam gelu ze scanneru nebo digitálního fotoaparátu/kamery
- úprava a optimalizace "obrázku" - záznamu gelu
- výběr pozice vzorku a záznam křivky optické hustoty vzorku
- odstranění pozadí
- korekce absorbančních profilů na základě referenčních spekter
- kontrola a korekce pozice proužků (píků)
- porovnání profilů (korelací profilů nebo porovnáním pozice proužků)
- výpočet matice podobnosti (koeficienty podobnosti)

- výpočet a grafické znázornění pomocí dendrogramu
- identifikace nového spektra porovnáním s databází

Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení molekulárních markerů je vhodné využít statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představuje prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu je možné sestavit matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení (výpočet frekvence alel, výpočet koeficientů genetické identity, výpočty genetických vzdáleností či podobností, clusterová /UPGMA – unweighted pair group method averages/ a ordinační /PCO – Principal Coordinates Analysis/ analýza a sestavení dendrogramů a ordinačních diagramů). Pro tyto účely je využíván program Statistica 6.0 (Statsoft) a MVSP (Kovach Comp. Serv.) (z důvodu možnosti výpočtu genetické distance dle Nei-Li metriky koeficientů podobnosti).

III. Srovnání aktuálnosti postupů

Předkládanou „Metodiku analýzy molekulárních markerů u jilmu, *Ulmus L.*“ lze hodnotit jako novou metodiku, protože v současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zahrnující optimalizované pracovní postupy pro izolaci DNA a analýzu molekulárních markerů u jilmu. Dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené v zahraničních vědeckých publikacích, které se zabývají problematikou analýzy jednotlivých markerů, většinou u jiných druhů jilmů, komplexní vyhodnocení použitelnosti jednotlivých markerů pak dostupné není. Molekulární markery představují ve srovnání s morfologickými či biochemickými markery kvalitativně nový přístup, který má na jedné straně obrovský potenciál využití, na straně druhé pak má i své limity. Reálná interpretace molekulárních dat pak vyžaduje volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Využití molekulárního markeru pro selekci požadovaných genotypů je předmětem předkládané metodiky.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika analýzy molekulárních markerů u jilmu uvádí optimalizované postupy pro izolaci DNA, uvádí nejen přehled jednotlivých metod, ale je poukázáno i na přednosti jednotlivých metod a metody jsou vyhodnoceny z pohledu rychlosti a pracnosti provedení, kvantity a kvality získané DNA. Ve druhé části jsou pak představeny základní techniky a metody určené pro analýzu selekčních markerů.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů u jilmu. Výstupem analýzy je pak spektrum markerů (amplifikovaných fragmentů DNA) použitelné pro charakterizaci jednotlivých genotypů. Molekulární markery nejsou dosud standardně pro tyto účely používány, mohou být ale vhodným doplňkem morfologické a cytologické analýzy. Uživatelé metodiky mohou být orgány státní správy, vlastníci lesa, správy NP, chráněných krajinných oblastí, výzkumná a šlechtitelská pracoviště, která mohou s výhodou využít znalostí o genetické struktuře populací lesních dřevin získaných na základě analýzy molekulárních markerů.

Metodika bude uplatněna prostřednictvím biotechnologické firmy Fubatech s.r.o., se kterou byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

V. Seznam použité související literatury

- Ballvora, A., Hesselbach, J., Niewohner, J., Leister, D., Salamini, F., Gebhardt, C. (1995). Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 82-90.
- Boucias, D.G., Tigano, M.S., Sosa-Gomez, D.R., Glare, T.R., Inglis, P.W. (2000a). Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Biological control* 19: 124-138.
- Boucias, D.G., Stokes, C., Suazo, A., Funderburk, J. (2000b). AFLP analysis of *Nomuraea rileyi* DNA. *Mycologia* 92: 638-648.
- Coates, D.J., Byrne, M. (2005). Genetics variation in plant populations: assessing cause and pattern. In: Henry, R.J. (ed.), *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic variation in higher plants*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK pp. 139.
- Coleman, M. (1998). The Elm problem: a molecular and morphological case study. M.Sc. degree. In: *Plant Taxonomy and Biodiversity*. Edinburgh University and Royal Garden Edinburgh.
- Coleman, M., Hollingsworth, M., Hollingsworth, P. M. (2000). Application of RAPDs to the critical taxonomy of the English endemic elm *Ulmus plotii* Druce. *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 241-262.
- Collada, C., Fuentes-Utrilla, P., Gil, L., Cervera, M.T. (2004). Characterization of microsatellite loci in *Ulmus minor* Miller and cross-amplification in *U. glabra* Hudson and *U. laevis* Pall. *Molecular Ecology Notes*, 4: 731-732.
- Čurn V., et al. (2005). Molekulární markery – protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Fischer, P.J., Gardner, R.C., Richardson, T.E. (1996). Single locus microsatellite isolation using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 4369-4371.
- Goodall-Copestake, W.P., Hollingsworth, M.L., Hollingsworth, P.M., Jenkins, G.I., Collin, E. (2004). Molecular markers and ex situ conservation of the European elms (*Ulmus* spp.). *Biological conservation*, 122: 537-546.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. (1989). Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L., Weir, B. S. *Sunderland: Plant population genetics, breeding and genetics resources*. Sinauer, Massachusetts, pp. 43-63.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- Hantula, J., Dusabenygasani, M., Hamelin, R.C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. Path.* 26: 159-166.
- Chakrabarti, S.K., Pattanayak, D., Sarmat, D., Chimote, V.P., Naik, P.S. (2006). Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biol. Plantarum* 50: 531-536.
- Charters, Y.M., Robertson, A., Wilkinson, M.J., Ramsay, G. (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Olifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* 92: 442-447.

- Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L., Zehr, B.E. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays L.*) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365-337.
- Karron, J. D. (1987). A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evol. Ecol.* 1: 47-58.
- Manel, S., Schwarz, M.K., Luikart, G. and Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kubátová, B., Čurn, V (2008). Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (*submitted*).
- Oborník, M., Klíč, M., Žižka, L. (2000). Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne de Botanique* 78: 1150-1155.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivar. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Schaal, B.A. and Olsen, K.M. (2000). Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 7024–7029.
- Sobotka, R., Dolanská, L., Čurn, V., Ovesná, J. (2004). Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *J. Appl. Genet.* 45: 161-173.
- Suwannakut, S., Boucias, D.G., Wiwat, Ch. (2005). Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *J. of Invertebrate Pathology* 90: 169–176.
- Thompson, J.D. (1999). Population differentiation in Mediterranean plants: insight into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, 82: 229–236.
- Tigano-Milani, M.S., Honeycutt, R.J., Lacey, L.A., Assis, R., McClelland, M. and Sobral, B.W.S. (1995). Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates as revealed by molecular markers. *J. of Invertebrate Pathology* 65: 274–282.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Homes, M., Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zebau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. - *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Application*. CRC Press Boca Raton, FL.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds): *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

- Whiteley, R. E., Black-Samuelsson, S., Clapham D. (2003). Development of microsatellite markers for the European white elm (*Ulmus laevis* Pall.) and cross-species amplification within the genus *Ulmus*. *Mol. Ecol. Not.*, 3: 598-600.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1992). Genetics analysis using RAPD markers. *Method Enzymol.* 260: 335-348.
- Zalapa, J.E., Brunet, J., Guries, R.P. (2008): Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.). *Molecular Ecology Resources*, 8: 109–112. b
- Zalapa, J.E., Brunet, J., Guries, R.P. (2009). Patterns of hybridization and introgression between invasive *Ulmus pumila* (*Ulmaceae*) and native *U. rubra*. *American Journal of Botany* 96: 1116-1128.
- Zietkiewics, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

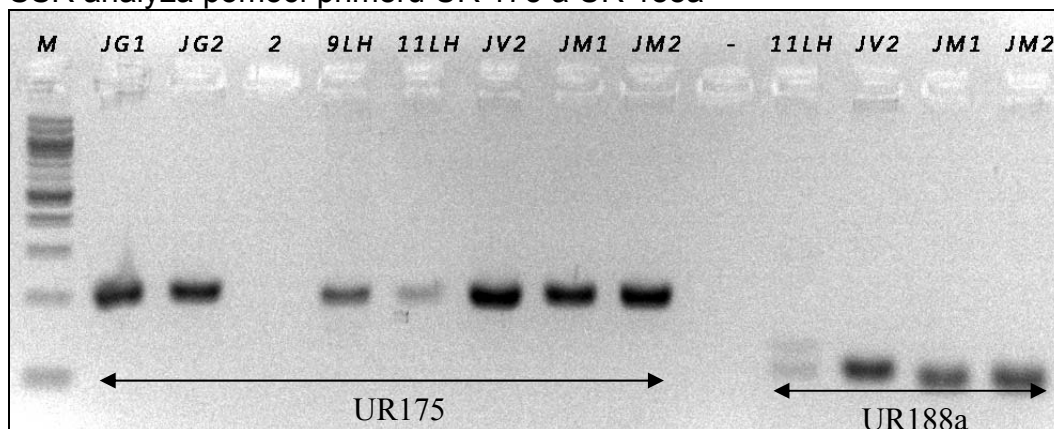
VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Čurn V. (2005).** Molekulární markery - protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.
- Čurn V., Kubátová B., Vávřová P., Suchá O., Čížková H. (2007).** Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis*: Comparison of populations in two man-made lakes of different age and history. - *Aquatic Botany* 86: 321-330.
- Čurn V., Nováková A., Šimáčková K., Ondřichová B., Bárta J. (2008).** Molecular markers as a tool for plant breeding and variety identification. In: Prohnes J., Badenes M.L.(eds): *Modern variety breeding for present and future needs*. Valencia, p. 699-703.
- Čurn V., Ovesná J., Sáková L., Sobotka R. (2002).** Identification of oilseed rape cultivars using AFLP markers. [Identifikace odrůd řepky olejně použitím AFLP markerů] - *Journal of Central European Agriculture* 3: 285-292.
- Čurn V., Žaludová (2007).** Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. In: Gupta S. (ed.): *Rapeseed Breeding. (Advances in Botanical Research, Volume 45)*. Elsevier Publ., pp. 155-179.
- Dolanská L., Čurn V. (2004).** Analysis of SLG gene – the molecular marker in hybrid breeding of oil seed rape. – *Journal of Central European Agriculture* 5: 23-28.
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2007).** Wild potato species: characterization and biological potential for potato breeding. - *Czech J. Genet. Plant. Breed.* 43: 73-81.
- Kavková M., Čurn V. (2005).** *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). - *Mycopathologia* 159: 53-63.
- Kavková M., Čurn V., Endrychová V. (2003).** Species composition and significance of mycorrhizas in young oak plantations of *Q. petraea* and *Q. robur*. – Fourth International Conference on Mycorrhizae: Mycorrhiza: fundamental and multiproposed, ICOM4th Montreal, Quebec, Canada, 10-15 August, 2004.
- Kubátová B., Čurn V. (2005).** Soubor metodik a laboratorních protokolů. BC ZF JU a Laboratoř molekulární biologie rostlin KB BF JU, Č. Budějovice.
- Kubátová B., Trávníček P., Bastlová D., Čurn V., Jarolímová V., Suda J. (2008).** DNA ploidy-level variation in native and invasive populations of *Lythrum salicaria* at a large geographical scale. - *Journal of Biogeography* 35: 167-176.
- Kukolíková B., Žaludová J., Čurn V., Koprna R. (2007).** Efficiency of marker assisted selection of self-incompatible oilseed rape varieties. - 6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007, p. 801.
- Nováková A., Čurn V., Bárta J., Šimáčková K., Heřmanová V. (2006).** SSR, ISSR and retrotransposon based markers and its application to potato variety identification. EAPR-EUCARPIA The Science of Selection. Potato Breeding Methodology for the 21st Century, Carlow, Ireland, 20th-22nd November 2006, p. 47.

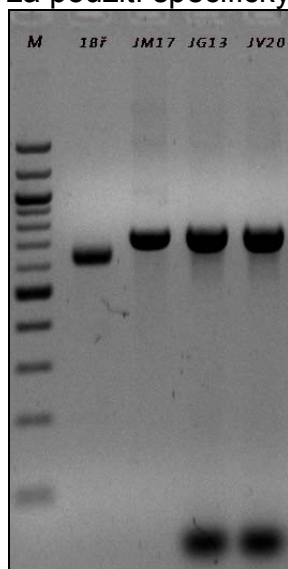
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2006).** Molecular markers as a tool for potato varieties identification. 5th Plant Genomics European Meetings, Venice, Italy, 11-14 October 2006, p. 215.
- Nováková A., Šimáčková K., Bárta J., Čurn V. (2007).** Potato variety identification by molecular markers. 6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007, p. 812.
- Nováková A., Šimáčková K., Kubátová B., Čurn V. (2008).** Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (*submitted*).
- Sáková L., Čurn V. (1998).** Identifikace a klasifikace vybraných odrůd brukvovitých plodin a dihaploidních linií řepky pomocí RAPD markerů. – *Czech J. Genet. Plant Breed.* 34: 61-67.
- Sáková L., Čurn V., Sobotka R. (2000).** Comparison of different DNA isolation methods for RAPD, AFLP and PCR-RFLP analyses. *Coll. Sci. Papers, Fac. Agric. České Budějovice, Ser. Crop Sci.* 17: 83-91.
- Sobotka R., Dolanská L., Čurn V., Ovesná J. (2004).** Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. – *Journal of Applied Genetics* 45(2): 161-173.
- Sobotka R., Sáková L., Čurn V. (2000).** Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassica. – *Curr. Issues Mol. Biol., Caister Acad. Press*, 2: 103-112.
- Suchá O., Vávřová P., Čížková H., Čurn V., Kubátová B. (2007).** Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis*: II. A comparative study of clones originating from two populations of different age. – *Aquatic Botany* 86: 361-368.
- Šimáčková K., Čurn V., Landa Z., Nováková A. (2006).** Utilisation of molecular and morphological markers for an assessment of genotypic and phenotypic variability of entomopathogenic fungi. – 10th Int. Symp. Genetics Industrial Microorganisms, June 24-28, 2006, Prague, p. 123.
- Šimáčková K., Čurn V., Nováková A., Kukulíková B. (2008).** Application of molecular markers for characterization fungal strains and evaluation of their genetic structure and stability. – XX Int. Congress Genetics, Berlin, Germany, July 12-17, 2008. p. 252.
- Travníček P., Kubátová B., Čurn V., Rauchová J., Krajníková E., Jersáková J., Suda J. (2010).** Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. – *Annals of Botany* (*in press*).
- Žaludová J., Kukulíková B., Čurn V. (2007).** Marker-assisted selection of self-incompatible oilseed rape plants. *Proc. 12th Int. Rapeseed Congress, Wuhan, China, Science Press USA*, pp.333-335.

VII. Příklady výstupů analýzy molekulárních markerů

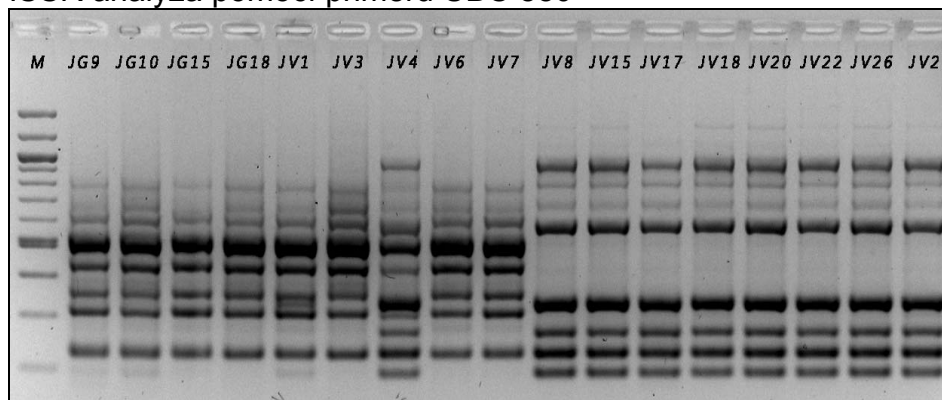
SSR analýza pomocí primerů UR 175 a UR 188a



PCR analýza ITS genu 4-5 za použití specifických primerů.



ISSR analýza pomocí primeru UBC 880



Název: Čurn V. a kol. (2010): Metodika analýzy molekulárních markerů u jilmu, *Ulmus* L.

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Barbora Kubátová, Ph.D.
Ing. Martina Novotná
Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.
Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Studentská 13
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 22.12.2010 (č.j. 37999/2010-16220/M11), jako certifikovaná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: VCurn@seznam.cz

ISBN: 978-80-7394-252-6