



Fakulta zemědělská a technologická  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

---

# OPTIMALIZOVANÁ METODIKA STANOVENÍ DIVERZITY GENETICKÝCH ZDROJŮ HOŘČIC S VYUŽITÍM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

---

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV **QK1910225 Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčice pro potravinářské a pícní účely.**



Autoři: Ing. Eva Jozová, Ph.D., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2023



# **Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

## **Fakulta zemědělská a technologická**

### **Optimalizovaná metodika stanovení diverzity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV **QK1910225 Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčice pro potravinářské a pícní účely.**

Ing. Eva Jozová, Ph.D.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D

České Budějovice, 2023



# **Optimalizovaná metodika stanovení diverzity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie**

Eva Jozová, Vladislav Čurn

jozovae@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice 2023

[www.fzt.jcu.cz](http://www.fzt.jcu.cz)

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1910225 **Zavedení a využití komplexních biotechnologických postupů k charakterizaci a tvorbě genových zdrojů a dalších výchozích materiálů hořčice pro potravinářské a pícní účely.**

Recenzenty metodiky byli:

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D. – FAPPZ ČZU v Praze

Ing Petr Zehnálek – ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou

*Text: ©2023 Jozová E., Čurn V.*

*Foto: ©2023 Jozová E., Rychlá A.*

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7694-040-6

ISBN 978-80-7694-040-6





## Obsah

Cíl metodiky.....	9
Vlastní popis metodiky .....	11
Úvod .....	11
Izolace DNA z rostlinného materiálu.....	13
Příprava rostlinného materiálu pro extrakci DNA.....	13
Izolace DNA pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle, 1991) .....	13
Měření koncentrace templátové DNA .....	15
Postup .....	15
Metodika mikrosatelitové analýzy (SSR) .....	16
Analýza mikrosatelitů.....	16
Fragmentační analýza .....	17
Vyhodnocování výsledků analýzy.....	25
Srovnání novosti postupů.....	30
Popis uplatnění metodiky.....	30
Ekonomické aspekty.....	31
Publikace předcházející metodice .....	33
Použitá literatura.....	33
Příloha .....	35
Obrazová příloha ukázek SSR markerů zobrazených pomocí fragmentační analýzy .....	35
Použité roztoky .....	46





## Cíl metodiky

Hořčice je druhou nejvýznamnější brukvovitou olejninou pěstovanou v České republice. Nejběžněji pěstovaným druhem je v našich podmínkách hořčice bílá (*Sinapis alba* L.), která patří mezi tradiční české olejninu. Je šlechtěna zejména k produkci semene využívaného pro potravinářské využití na výrobu hořčic nebo jako koření při konzervaci zelenin. Rovněž je pěstována jako velmi významná meziplodina. V menší míře se v České republice ještě pěstuje hořčice sarepská (*Brassica juncea* L.).

Pro úspěšné vyšlechtění nových odrůd je nezbytná vhodná volba rodičovských komponent pro křížení. Proto je třeba znát jejich vlastnosti, nejen morfologické a kvalitativní, ale nezbytná je i znalost jejich genetické podobnosti. Molekulární markery mohou být vhodným nástrojem, jak odhalit geneticky velmi podobné rodiče a zamezit tak zužování genetické diverzity.

Cílem této metodiky je popsat takové molekulární analýzy, díky kterým bude šlechtitel, popř. jiný uživatel schopen rozpoznat nejen jednotlivé druhy hořčice, ale zejména rozpoznat jednotlivé odrůdy. Díky charakteristickým spektrům markerů u jednotlivých odrůd, bude možná jejich přesná identifikace a bude možné odhalit záměny genotypu, hodnotit pravost odrůd, určit směsné vzorky, popř. nevyrovnané odrůdy.

Metodika popisuje detailní postupy přípravy rostlinného materiálu, izolaci DNA o dostatečné kvalitě a koncentraci, postupy PCR analýzy, přesný popis použitých mikrosatelitových markerů včetně jejich charakteristik, přípravu vzorků pro fragmentační analýzu a doporučený postup pro vyhodnocení výstupů z fragmentační analýzy.



## Vlastní popis metodiky

### Úvod

Hořčice bílá (*Sinapis alba* L.) je druhou nejvýznamnější brukvovitou olejninou pěstovanou v České republice a Česká republika je spolu s Kanadou a Ukrajinou jedním z největších světových producentů a vývozců této plodiny. Hořčice bílá je pěstována jak pro produkci semene, tak jako meziplodina na zelené hnojení. Využití má i při pěstování v ekologických biopásech, kde je významnou nektarodárnou a pylodárnou plodinou pro včely.

Hořčice bílá pochází z oblasti Blízkého východu a Středomoří, ale tato plodina je po tisíciletí pěstována po celém světě s rozličným uplatněním (Hemingway 1995; Hanelt 2001; Ruan et al. 2019). Hořčice bílá je odolná vůči suchu (Kumari et al. 2020) a je odolná vůči závažným chorobám a hmyzím škůdcům (Bodnaryk a Lamb 1991), vykazuje fyto-sanitární biofumigační vlastnosti (Valdes et al. 2011) a je také důležitou nektarodárnou a pylodárnou rostlinou pro včely (Masierowska a Pietka 2014). V menší míře se v České republice ještě pěstuje hořčice sarepská (*Brassica juncea* L.). Hořčice černá (*Brassica nigra* L.) a hořčice habešská (*Brassica carinata* Braun) se u nás nepěstují (Mikšík et al. 2007).

Hořčice bílá je šlechtěna zejména k produkci semene využívaného pro potravinářské využití na výrobu pochutin nebo jako koření při konzervaci zelenin (Baranyk, 2010). Pokrutiny po lisování oleje obsahují vysoký obsah bílkovin (37 %) a dalších nutričně cenných látek, které jsou velmi chutné pro hospodářská zvířata. Dále je hořčice využívána jako meziplodina pro zelené hnojení a na píci, pro zakládání vymrzajícího mulče pro výsev kukuřice nebo slunečnice a také pro zelené hnojení s antinematodním účinkem proti háďátku řepnému (SDO, 2020). Osevní plochy mají v posledních letech spíše kolísající charakter. Za posledních 15 let byla největší osevní plocha v roce 2009 s rozlohou přes 40 tis. ha, nejnižší hodnota byla zaznamenána v roce 2017 s rozlohou cca 10 tis. ha.

Ačkoliv hořčice nedosahuje tak významného pokrytí osevních ploch jako ostatní olejniny, je třeba věnovat jejímu šlechtění pozornost i pro její široké využití v zemědělství a potravinářství.

Pro úspěšné vyšlechtění nových odrůd je třeba volit vhodné rodičovské komponenty. Proto je třeba znát jejich vlastnosti, nejen morfologické, ale i genetické. Molekulární markery jsou velmi vhodným nástrojem k odhalení geneticky velmi podobných rodičovských komponent a díky tomu je možné zamezit zužování genetické diverzity. Jedním z nepoužívanějších markerů, které dokáží detekovat vzdálenost či podobnost na úrovni genotypu jsou mikrosatelity (Havlíčková, 2014). Využití mikrosatelitů u hořčic je výhodné i kvůli dobré znalosti celého genomu a velkému množství známých specifických SSR primerů pro rod *Brassica* (Čurn et al., 2012), či použití cross-species mikrosatelitových primerů odvozených např. od druhu *Arabidopsis* (Bell a Ecker, 1994). Hodnocení diverzity v markerových lokusech je v současné době nejproveditelnější strategií pro charakteristiku diverzity mezi hořčicemi. Molekulární markery nabízejí nejlepší odhad genetické diverzity, protože jsou nezávislé na vlivu environmentálních faktorů (Havlíčková et al. 2014).

**Jozová E., Čurn V. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diverzity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie**

Pro ověření vhodnosti této metodiky bylo využito sortimentu 353 odrůd a šlechtitelského materiálu tří druhů hořčic – *Sinapis alba*, *Brassica nigra* a *B. juncea*. Veškeré osivo bylo poskytnuto společností OSEVA PRO, Výzkumný ústav olejin Opava. Konkrétně bylo testováno: 204 genotypů pro druh *Sinapis alba*, 36 genotypů pro druh *Brassica nigra* a 113 genotypů pro druh *Brassica juncea*. Pro hodnocení mikrosatelitových markerů byly použity primery: BoREM1b, BolAB19TF, BoPC34, P381, D3, D11, D12, P7, P9, P30, P35.

## Izolace DNA z rostlinného materiálu

### Příprava rostlinného materiálu pro extrakci DNA

Rostlinný materiál, který je používán pro extrakci DNA může být několikerého typu. Může se jednat o semenný materiál nebo vzorky zelených rostlin. V případě semenného materiálu je nejprve nutné semena vyset. Výsevním materiálem může být klasický výsevní substrát nebo perlit. Pokud je použit perlit nedochází pak ke kontaminaci rostlinek substrátem pro další použití. Rostliny se nechají vyrůst do fáze plně vyvinutých děložních lístků, tento proces trvá přibližně jeden týden. Odběr vzorků pro izolaci DNA v této fázi se jeví jako optimální, protože koncentrace DNA je velmi vysoká a děložní lístky jsou velmi měkké a je možné je velmi snadno homogenizovat. Dalším typem materiálu jsou plně vyvinuté pravé listy. U tohoto typu materiálu mohou způsobovat problémy při izolaci a purifikaci DNA např. silice. Čerstvý materiál je možné ihned extrahovat. V případě, že je nutné vytvořit směsné vzorky je nejvhodnější materiál nechat šetrně vysušit v papírových sáčcích vložených do silica gelu po dobu přibližně jednoho týdne. Po důkladném vysušení se všechny materiál převede do 2 ml sterilních mikrocetrifugačních zkumavek. Přidají se 2 skleněné kuličky a materiál se homogenizuje pomocí homogenizátoru (např. Beat Ruptor 96) po dobu 30 sec a při maximální frekvenci. Takto zhomogenizovaný materiál je možné skladovat v mrazáku při  $-20^{\circ}\text{C}$  až do doby samotné extrakce DNA. Pokud není k dispozici robotický homogenizátor, je možná ruční homogenizace. Záleží na možnostech a zvyklostech laboratoře.

### Izolace DNA pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle, 1991)

Tato izolační metoda je vhodná pro izolaci DNA z většího množství rostlinného materiálu. Získaná DNA je velmi kvalitní a čistá, při dlouhodobém skladování nedegraduje. Ověřená doba použití DNA je až 4 roky. Takto čistá DNA je velmi vhodná při využití metod jako je např. AFLP, SSR a ISSR.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45M 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 jej lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

Chemikálie:

- ethanol (96%, 70%)
- 2x CTAB-PVP extrakční pufr (2% CTAB, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1,4mM NaCl, 1% PVP-40000)
- 2-merkaptoethanol
- 5% CTAB
- chloroform : IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA)
- isopropanol

Přístroje:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Pracovní postup:

- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 1000  $\mu$ l extrakčního pufru (990  $\mu$ l 2x CTAB-PVP +10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanol), materiál promíchat s pufrům (v případě čerstvého materiálu nebo menšího množství listů je možné objem extrakčního pufru snížit na polovinu). Použitému objemu je nutné vybrat vhodný objem mikrocentrifugačních zkumavek (1,5 nebo 2,0 ml)
- nechat 45-60 min inkubovat při 65 °C ve vodní lázni, promíchat každých 15 minut
- centrifugovat na 14 000 rpm (maximum) 10 minut – v případě velkého znečištění je možné tento krok prodloužit na 15 minut
- převést supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 750  $\mu$ l chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 min nechat protřepávat (v případě použití polovičního objemu extrakčního pufru se přidává pouze 500  $\mu$ l chloroformu : IAA)
- centrifugovat 5 min na maximum
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 1/5 (cca 100-200  $\mu$ l) 5% CTAB a promíchat
- přidat 750  $\mu$ l chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 minut protřepávat (v případě použití polovičního objemu extrakčního pufru se přidává pouze 500  $\mu$ l chloroformu : IAA)
- centrifugovat 5 min na maximum
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 2/3 izopropanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20°C přes noc
- centrifugovat 5 minut na maximum při 4 °C
- odstranit supernatant
- přidat 300  $\mu$ l TE pufru a nechat 30-60 minut rozpouštět na třepáče při 37 °C
- přidat 2 objemy (600  $\mu$ l) 96% studeného ethanolu (z mrazáku), 2-3x promíchat
- nechat v -20°C 20 min - 12 hod (přes noc)
- centrifugovat 10 minut na maximum při 4 °C
- odstranit supernatant

- přidat 1000  $\mu$ l 70% studeného etanolu (z mrazáku) a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- odstranit supernatant
- přidat 1000  $\mu$ l 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- přebytečnou tekutinu odpipetovat a nechat sušit při 37 °C po dobu 15-20 minut (nenechat pelet přeschnout, špatně se rozpouští)
- přidat 100 - 200  $\mu$ l TE pufru (podle množství peletu) a cca 40 minut nechat rozpouštět při 37 °C
- skladovat v -20 °C

## Měření koncentrace templátové DNA

Analýza mikrosatelitů je velmi citlivá na čistou DNA se stejnou koncentrací u všech používaných vzorků. Proto je třeba určit koncentraci DNA vhodnou metodou. Roztok nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleových kyselin, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů.

Pro potřeby měření koncentrace byl použit spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu). Sledovány byly zejména parametry: koncentrace DNA vyjádřená v ng/ $\mu$ l, poměr 260/280, který by měl být v ideálním případě v rozmezí 1,8-2,0 a poměr 260/230, který by měl mít hodnoty od 2,0 do 2,2.

### Postup

- napipetovat 1,5  $\mu$ l slepého vzorku dle pufru, ve kterém je DNA rozpuštěna (1x TE pufr)
- postupně nanášet 1,5  $\mu$ l každého vzorku (před nanášením je potřeba lehce promíchat, před samotným měřením v programu vzorek popsat)
- výstupem je tabulka dat (koncentrací DNA a parametrů čistoty) ve formátu pdf. nebo xls.

Pokud DNA vzorku nedosahuje potřebných hodnot, je třeba vzorky přechistit, např. pomocí octanu sodného.

## Metodika mikrosatelitové analýzy (SSR)

Nejvhodnější metodou pro identifikaci odrůd je mikrosatelitová analýza (SSR). Mikrosatelity jsou krátké tandemově se opakující repetice o délce 1-6 párů bází. Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50-ti kopiích (Ashkenazi et al., 2001). Mikrosatelity mohou být nalezeny jak v nekódujících, tak i kódujících úsecích genomu (Varshney et al., 2005). Mikrosatelity se řídí jednoduchou mendelistickou dědičností, proto mohou být při použití pro velmi příbuzné druhy konzervativní, ovšem pro odlišení odrůd se ukázaly jako vhodný pomocník (Pilinsky et al., 2011). Počet opakování jednotky v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu. Délku alely lze zjistit po elektroforetické/fragmentační analýze PCR produktů daného lokusu díky použití primerů specifických pro příslušný lokus (Čurn et al., 2012).

### Analýza mikrosatelitů

Analýza mikrosatelitů je často využívanou metodou pro identifikaci odrůd. Výhodou této analýzy je poměrně velké množství známých mikrosatelitních lokusů a jejich výskyt v genomu, kodominantní dědičnost, dostupné techniky analýzy mikrosatelitních (SSR) markerů a jejich opakovatelnost (Seyfert et. al., 2008). Pro potřeby hodnocení variability jak na druhové, tak i odrůdové úrovni byly optimalizovány postupy pro známé mikrosatelitové primery, ovšem prvotně využívané pouze pro hodnocení mezidruhové variability (Louarn et al., 2007, Cui et al., 2008). Konkrétně se jedná o tyto primery: BoREM1b, BoLAB19TF, BoPC34, P381, D3, D11, D12, P7, P9, P30, P35.

### PCR reakce

#### Chemikálie:

- PPP master mix (Top Bio) nebo OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB)
- templátová DNA (konc. 200 ng/μl)
- mikrosatelitové primery (konc. 10 pmol)
- PCR H<sub>2</sub>O

#### Přístroje:

- PCR thermocycler, vortex, mini centrifuga, sada automatických pipet



## Fragmentační analýza

Pro usnadnění a zlevnění analýzy lze dohromady využít až 4 různě značené fluorescenční barvy, tzn. že výstupem je elektroforeogram s různými barvami píků. Komplikací může být vysoká pořizovací cena značení primerů a optimalizace všech kombinací tak, aby u všech píků byla stejná intenzita záření, která je vyjádřena výškou píků. Velikost jednotlivých píků je odečítána podle velikostního standardu (LIZ 500, nebo LIZ 600). Další možností úspory při fragmentační analýze, která byla využita právě pro tyto účely, je využití univerzálního značeného primeru, konkrétně byly použity značené primery Ba02 nebo Ba03 (Enkerli et al., 2001), které jsou standardně využívány pro analýzu SSR u entomopatogenních hub. Tyto univerzální primery byly značeny pomocí 6-FAM fluorescenční barvou. V tomto případě jsou používány pouze jako značený marker a neovlivňují vlastní hodnocení. Princip nasedání primerů je zobrazen na obrázku 1.

Jelikož u některých SSR primerů jsou rozdíly v PCR produktech v případě porovnání jednotlivých odrůd jen v jednotkách bází, je třeba vyhodnocovat výsledky sofistikovanější metodu, jakou je fragmentační analýza.

Amplifikované fragmenty jsou značeny fluorescenční značkou, která je navázána na specifické primery. Dochází k naznačení vždy jednoho primeru (forward). Výstupy jsou ve formě píků. Jeden pík odpovídá jedné alele.

### PCR reakce

#### Složení PCR reakce pro amplifikaci mikrosatelitů

- 5 µl Master Mix
- 3,75 µl PCR vody
- 0,1 µl každého primeru (10 pmol)
- 0,05 µl BSA
- 1 µl DNA (5-10 ng/µl)

#### Teplotní cyklus:

(Louarn et al., 2007):

- počáteční denaturace	5 min	94 °C
- 31 cyklů	1 min	95 °C
	1 min	52 °C/59 °C
	1 min	68 °C/72 °C*
- konečná elongace	5 min	68 °C/72 °C*
- stop	∞	4 °C

\* teplota 68 °C platí při použití master mixu OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB) / teplota 72 °C platí při použití master mixu PPP Master mix (TopBio)

\*\* NEB – master mix OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB) / TopBio – master mix PPP Master mix (TopBio)

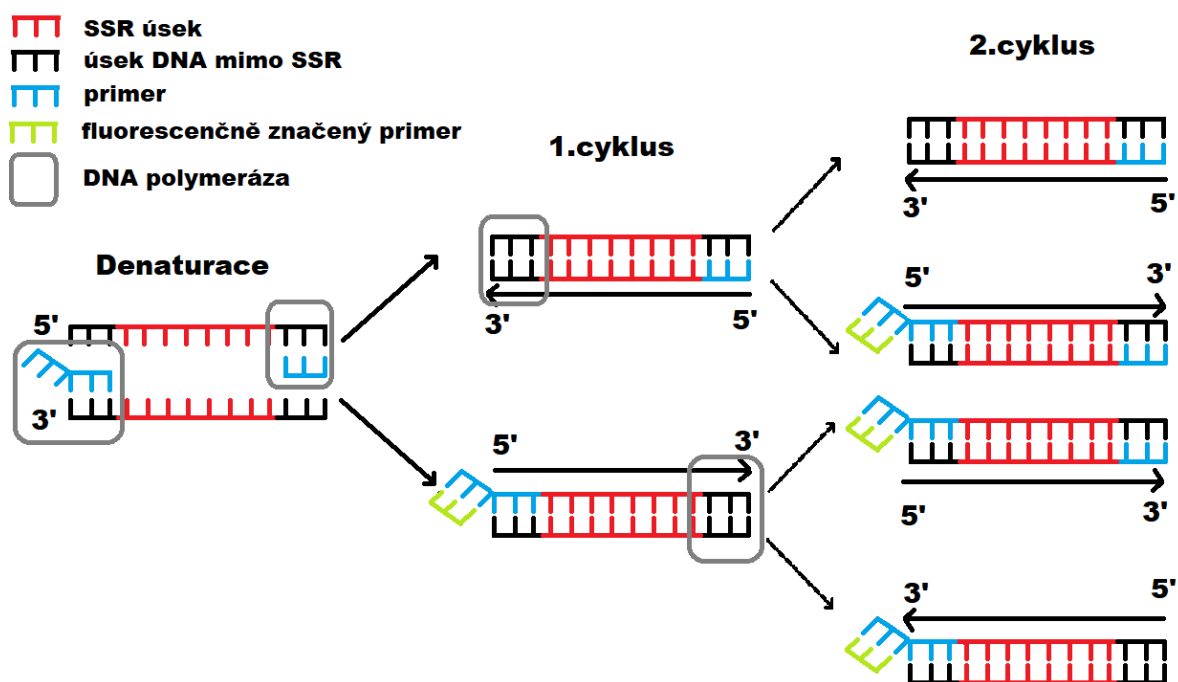
Optimalizace reakcí probíhala na thermocyleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) podle následujícího teplotního profilu:

#### Příprava vzorku pro FA:

- 10  $\mu$ l Hi-Di Formamide
  - 0,5  $\mu$ l Size Standard GeneScan 500 LIZ
  - 1  $\mu$ l PCR reakce
- takto připravený vzorek inkubovat při 94 °C po dobu 5 minut  
- ihned zchladit po dobu minimálně 2 minut

Fragmentační analýza probíhala na genetickém analyzátoru ABI3500 (Applied Biosystems). Vyhodnocování fragmentů probíhalo v programu GeneMapper (Applied Biosystems).

Sekvence použitých primerů pro FA a jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1.



Obrázek 1 Schéma nasedání fluorescenčně značeného primeru v PCR reakci

Tabulka 1 Popis specifických primerů a jejich vlastností při použití pro fragmentační analýzu

Primer	sekvence	annealing	MM	Ředění*	amplifikace			polymorfismus	
					B.juncea	B.nigra	S.alba	druhový	odrůdy
<b>BoREM1b</b> (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CTC CGA AAG TGG GGA AAG G R: TGT GTC AGA AAG CGA GAA GG	59 °C	Top	1:5	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>BoIAB19TF</b> (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CAA GCC ACC TCA CCT TAG CC R: GAA ATC CCA GAG ACT GAA AAC C	59 °C	Top	1:10	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>BoPC34</b> (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CTC CAA GAC CGT AGA GGA GGA R: AAG CCA ACA AAC TTC AAC AAC A	59 °C	Top	1:10	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>P381</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CTA GTC GGT CGT CAG AAC A R: ATG TGG CAT AAA ACT CGA	52 °C	Top	1:10	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>A</b> některé	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>D3</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C GGA GCC AGG AGA GAA GAA GG R: CCC AAA ACT TCC AAG AAA AGC	52 °C	Top	1:10	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>D11</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba03): GCA TAG ATA TGT CTC GCA CC F: GCA TAG ATA TGT CTC GCA CCG CCA ACT TAA TTG ATG GGG TC R: CCT CAA TGT TCT CTC TCT CT	52 °C	NEB	Neředit	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>D12</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C ATG TCC GGA TAA CCG AAT CC R: GAA GCT TTT CAA TTT TTA AGT T	52 °C	Top	1:5	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>P7</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C TCC CCT CTT TCC TCT CTC TCT AGG R: AAA CCT CTC AAA AAC CCC TAA ACG	52 °C	Top	1:5	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b> některé	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>P35</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C TCC CAC GCC TTC TAG CCT TC	52 °C	Top	1:10	<b>A</b>	<b>N</b>	<b>A</b> některé	<b>A</b>	<b>A</b>

	R: ACC GGA GCT TTT CTG TTG CC								
<b>P30</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C AAA TTG TTT CTC TTC CCC AT R: GTG TTA GGG AGC TGG AGA AT	56 °C	NEB	1:5	<b>A</b>	<b>A</b> některé	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>P9</b> (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C AGG ACA CCA GGC ACC ATA TA R: CAT TGT TGT CTT GGG AGA GC	52 °C	Top	1:10	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b> některé	<b>A</b>	<b>A</b>

\* Amplifikované produkty mají příliš vysokou koncentraci, proto je nutné je ještě dále naředit, nejlépe PCR vodou.

Vzhledem k tomu, že byly hodnoceny genotypy několika druhů hořčic, došlo u některých mikrosatelitů k nasedání primerů na více místech v genomu. Konkrétně se jedná o tyto markery: **D3** a **P9**. Na následujících stránkách jsou uvedeny výsledky specifických amplifikací alel pro jednotlivé druhy hořčice. Slovní popis „ANO“ označuje, že alela se u tohoto druhu amplifikovala alespoň v jednom genotypu.

**BoREM1b**

	173	175	181	184	186	187	190
<i>Sinapis alba</i>	-	ANO	ANO	-	-	ANO	-
<i>Brassica juncea</i>	-	-	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	-	-	-	-	ANO	ANO

**BoIAB19TF**

	311	313	314	315	316	317	318
<i>Sinapis alba</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	-	ANO	-	ANO	ANO	ANO	-
<i>Brassica nigra</i>	-	-	-	-	-	ANO	ANO

**BoPC34**

	143	149	150	151
<i>Sinapis alba</i>	-	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica juncea</i>	ANO	-	-	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	ANO	ANO	ANO

**P381**

	213	229
<i>Sinapis alba</i>	ANO	ANO
<i>Brassica juncea</i>	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	ANO	ANO

**D3\_A**

	157	158	162	163
<i>Sinapis alba</i>	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica juncea</i>	-	-	-	-
<i>Brassica nigra</i>	-	-	-	-

**D3\_B**

	167	168	170	171	176	178	179	182	183	184
<i>Sinapis alba</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	-	-	-	-	ANO	-	ANO	-	-	-
<i>Brassica nigra</i>	-	-	ANO	-	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO

**D3\_C**

	194	198
<i>Sinapis alba</i>	-	-
<i>Brassica juncea</i>	-	-
<i>Brassica nigra</i>	ANO	ANO

**D3\_D**

	185	188
<i>Sinapis alba</i>	-	-
<i>Brassica juncea</i>	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	ANO	ANO

**D12**

	338	340	342	344	346	348	351	357	362	364	366	368	370	374
<i>Sinapis alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	-	ANO	ANO	-	-	-	-	-	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO

**D11**

	158	162	168	170	174	176	180	182	186	192	194	196	200	205	210	215	220	224	226	230
<i>Sinapis alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	-	-	-	ANO	ANO	-	ANO	ANO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**P7**

	141	143	146	148	153	156	158	160	162
<i>Sinapis alba</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	-	-	ANO	-	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	-	ANO	-	-	-	-	-	-

**P9\_A**

	125	130	132	134	135	136	138
<i>Sinapis alba</i>	ANO	-	ANO	-	-	-	ANO
<i>Brassica juncea</i>	-	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	ANO	-	ANO	-	-	-

**P9\_B**

	145	151	152
<i>Sinapis alba</i>	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica juncea</i>	-	-	-
<i>Brassica nigra</i>	ANO	-	-

**P30**

	153	155	157	166	168	172	174	196	205	210	217
<i>Sinapis alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	-	ANO	-
<i>Brassica nigra</i>	-	ANO	-	ANO	-	-	-	-	ANO	ANO	ANO

**P35**

	145	149	151	152	153	155	157	159	161	163	173	177	183	185	187	189	191	193	195	197	199
<i>Sinapis alba</i>	-	ANO	-	ANO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica juncea</i>	ANO	ANO	ANO	-	ANO	-	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
<i>Brassica nigra</i>	-	ANO	-	-	ANO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ANO	-	-	ANO	ANO	-	-

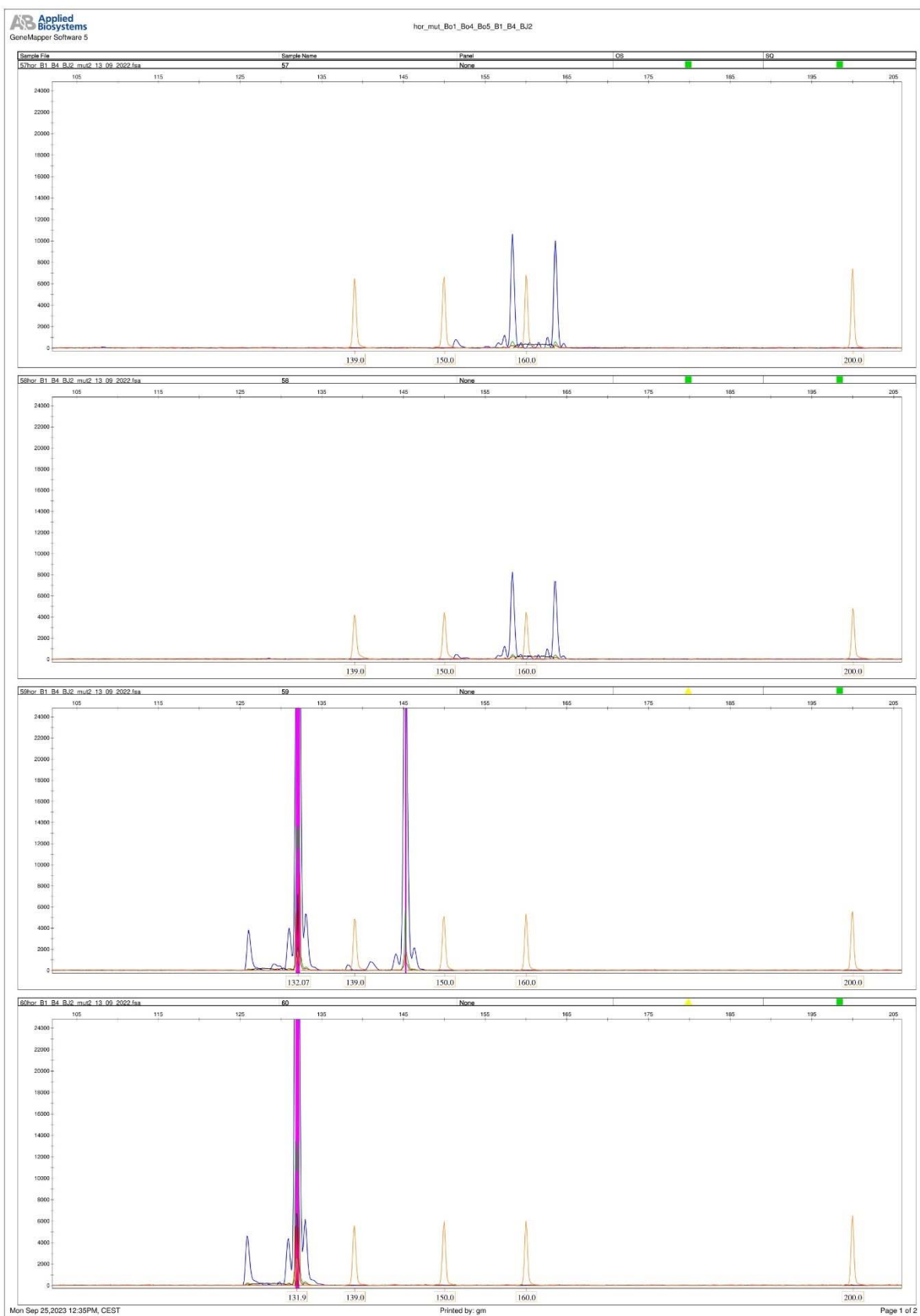


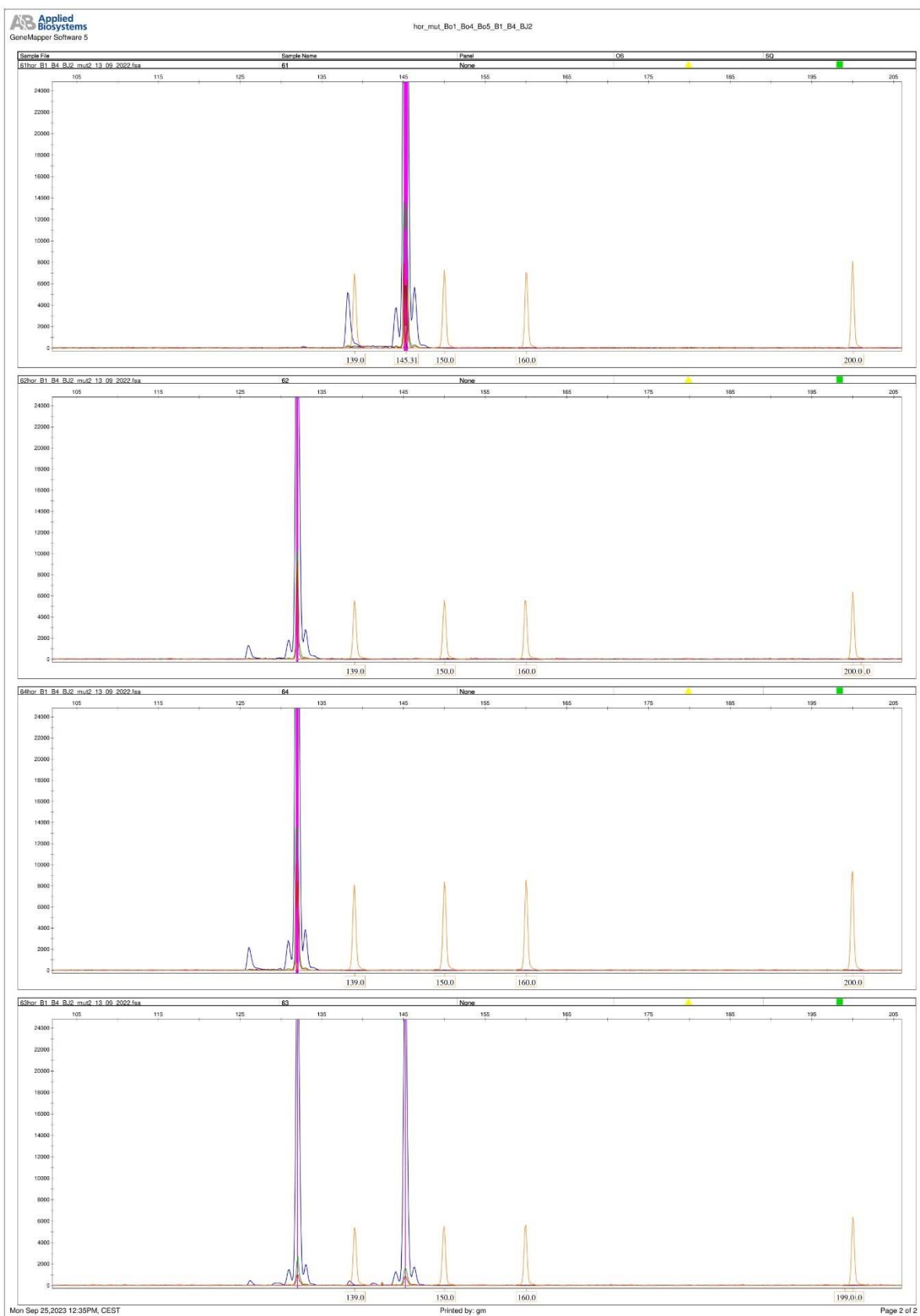
## Vyhodnocování výsledků analýzy

Výstupy z fragmentační analýzy je nutné následně zpracovat, buď pomocí automatického vygenerování binární matice nebo ručním odečítáním, které je sice náročnější, ale přesnější. Každý mikrosatelitový marker má skladbu několika alel, které se pravidelně vyskytují a opakují. Data lze zaznamenávat formou binární matice nebo formou matice velikosti alel, která zaznamená, zda je jedinec homozygot či heterozygot.

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny ukázky výstupů pro 8 různých jedinců hodnocených pomocí mikrosatelitového markeru P9 pomocí programu GeneMapper od společnosti Applied Biosystems a následné převedení do podoby binární matice a matice zobrazující velikosti/délku alel.

**Jozová E., Čurn V. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diversity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie**





Obrázek 2 Výstup z programu GeneMapper pro osm náhodných grnotypů hořčic amplifikovaných pomocí markeru P9

Tabulka 1 Ukázka zaznamenání dat formou binární matice

	P9				
vzorek	132	139	145	158	164
57	0	0	0	1	1
58	0	0	0	1	1
59	1	0	1	0	0
60	1	0	0	0	0
61	0	1	1	0	0
62	1	0	0	0	0
63	1	0	0	0	0
64	1	0	1	0	0

Tabulka je ukázkou 8 reálných vzorků uvedených na obr 2 pro mikrosatelitový marker P9 odečtených z výsledků fragmentační analýzy. U tohoto markeru bylo odečteno 5 různých alel v rozsahu od 132 do 164 bp.

Tato forma zápisu je vhodná např. pro výpočet matice podobnosti.

Similarity matrix

	57	58	59	60	61	62	63	64
57	1,000							
58	1,000	1,000						
59	0,200	0,200	1,000					
60	0,400	0,400	0,800	1,000				
61	0,200	0,200	0,600	0,400	1,000			
62	0,400	0,400	0,800	1,000	0,400	1,000		
63	0,400	0,400	0,800	1,000	0,400	1,000	1,000	
64	0,200	0,200	1,000	0,800	0,600	0,800	0,800	1,000

Matice podobnosti je vhodným pomocníkem při výběru rodičů pro další křížení. Hodnoty se pohybují od 0 do 1. Čím více se hodnota přibližuje číslu 1, tím větší podobnost mezi dvěma jedinci je. Ideální je tedy vybírat ty rodiče, kteří jsou od sebe na základě této analýzy více vzdálení. Tím bude zachována genetická diverzita v rámci druhů a nebude docházet ke ztrátě zajímavých a pro dané druhy charakteristických genů/znaků. (Výše uvedený výpočet matice podobnosti byl zpracován v programu MVSP za použití algoritmu Gower General Similarity Coefficient).

Tabulka 2 ukázka zaznamenání dat formou velikosti alel

	P9	
<b>57</b>	158	164
<b>58</b>	158	164
<b>59</b>	132	145
<b>60</b>	132	132
<b>61</b>	139	145
<b>62</b>	132	132
<b>63</b>	132	132
<b>64</b>	132	145

*Tabulka 4 znázorňuje zaznamenání dat ve formě velikosti alel. V případě vzorků 60, 62 a 63 se o jedná homozygota, ostatní odrůdy jsou heterozygoti.*

## Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku “Metodika pro hodnocení genetické variability u hořčic“ lze hodnotit jako novou. V současnosti není k dispozici ucelená metodika pro hodnocení genetické variability na úrovni druhové či odrůdové se zaměřením na hořčice pěstované v ČR. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou molekulárních markerů zejména na úrovni rodové. 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, avšak na straně druhé i své limity. Reálná interpretace molekulárních dat obvykle vyžaduje kvalifikovanou volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Využití analýzy molekulárních markerů pro popis a charakterizaci genotypů je předmětem předkládané metodiky. Výhodou je možnost výběru vhodného postupu dle potřeb šlechtitelů a podle vybavenosti laboratoře. Tyto molekulární markery jsou optimalizovány tak, aby bylo možné dostatečně přesně určit polymorfismus na úrovni nejen druhů, ale zejména odrůd, popsat a identifikovat odrůdy na molekulární úrovni a určit i genetickou vzdálenost analyzovaných odrůd, resp. popsat míru genetické variability u souboru analyzovaných odrůd.

## Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro genotypizaci odrůd hořčic pomocí SSR markerů v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru rostlinného materiálu a různých variant vstupního materiálu, izolaci DNA, PCR až po popis možných metod pro vyhodnocení získaných dat, které jsou standardně používané na pracovišti Katedry genetiky a biotechnologií, FZT JU.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro rychlou a spolehlivou detekci k účelům odlišení odrůd u nás pěstovaných druhů hořčic. Jako vhodný molekulární marker se jeví SSR markery, jejichž analýza je založena na amplifikaci úseků obsahující mikrosatelitové alely o různé délce.

Ačkoliv molekulární markery nejsou dosud standardně využívány pro potřeby odlišení odrůd, ale víceméně pouze k odlišení druhů (řada ekologických a taxonomických studií u hořčic), mohou být vhodným doplňkem při hodnocení morfologických dat. Výhodou těchto analýz je zejména rychlost a možnost detekovat polymorfismus již v raném stádiu rostliny nedestruktivní metodou a není třeba čekat do doby, kdy jsou dobře hodnotitelné morfologické znaky. Analýzy také nejsou ovlivňovány faktory vnitřního a vnějšího prostředí.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště a šlechtitelské stanice, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy molekulárních markerů. Na základě této metodiky lze identifikovat odrůdy, hodnotit čistotu a odrůdovou pravost v průběhu šlechtění a množení.

Další uplatnění metody je při hodnocení genetické odlišnosti odrůd a výběru vhodných rodičovských komponent pro další šlechtění. Metodika bude uplatněna prostřednictvím společnosti OSEVA PRO. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## Ekonomické aspekty

Molekulární markery popisované v této metodice mají značný ekonomický význam pro semenářské či obchodní firmy a šlechtitelská pracoviště (hodnocení pravosti a čistoty osiva, odrůdové deklarace produktu – semen, selekce genotypů při šlechtění). Vzhledem k tomu, že u většiny ekonomicky významných plodin dochází k zužování genetické diverzity, mohou právě molekulární markery velice rychle pomoci s genetickým popisem a identifikací odrůd. Výhodou těchto markerů je, že lze analyzovat mladé rostliny nedestruktivním způsobem a po rychlé analýze ponechat pouze rostliny žádaného genotypu, čímž se významně sníží náklady na dopěstování a doba šlechtění jedné odrůdy se může výrazně zkrátit. Důležitá je i rychlost analýzy, kdy pro detailní morfologickou analýzu je zapotřebí celá doba vegetace, v případě molekulární analýzy jsou pak výsledky k dispozici i v řádu hodin.

Pro běžně vybavenou molekulárně-biologickou laboratoř jsou náklady spojené s analýzou SSR markerů minimální, pokud je ovšem dostačující zobrazení výsledků pouze na agarózovém gelu. Stačí základní přístrojové vybavení (termocycler, elektroforetická vana, váhy, centrifuga, pipety). Cena izolačního kitu se pohybuje v hodnotách cca 15 tis – 25 tis. Kč pro 250 vzorků, tzn. 60-100 Kč na vzorek. Tento kit lze zaměnit za mnohem levnější alternativu izolace pomocí CTAB-PVP, kde částka dosahuje přibližně třetinových nákladů. Tato metoda je sice pracnější a zdouhavější, ale vyizolovaná DNA má vyšší koncentraci kvalitnější DNA a oproti DNA vyizolované pomocí kitu je možné DNA použít pro analýzy i po několika letech vhodného skladování. Další položkou je syntéza specifických primerů, kde se cena jednoho primeru pohybuje kolem 160 Kč. Ostatní položky nevyžadují nutnost specifikace a jsou používány dle zvyklostí laboratoře.

Analýza mikrosatelitů pomocí fragmentační analýzy vyžaduje výraznější náklady na pořízení genetického analyzátoru, který se pohybuje řádově v jednotkách milionů. Další náklady jsou spojené se syntézou značených primerů. Kdy cena jednoho značeného primeru se pohybuje v řádech nižších tisíců podle použité fluorescenční barvy. Tyto náklady jsou ale díky této metodice výrazně sníženy, jelikož pro analýzy jsou použity pouze 2 fluorescenčně značené primery na 11 klasických primerových párů, tzn. úsporu v řádu desítek tisíc korun. Náklady na fragmentační analýzu lze ale snížit několika způsoby. Genetický analyzátor není nezbytností, jelikož analýzu si lze objednat formou služby, kde cena jedné analýzy vychází do 100 Kč. I tyto náklady lze redukovat a to více způsoby. Např. lze použít 4 značené forward primery s odlišným fluorescenčním značením, které budou analyzovány současně v jednom běhu fragmentační analýzy a tím se náklady na službu sníží čtyřnásobně. Popřípadě využití jednoho značeného primeru, v tom případě pak musí mít výsledné amplikony odlišné velikosti,

aby se píky vzájemně nepřekrývaly. Tato metoda je ovšem náročnější na optimalizaci, pokud je ovšem optimalizace úspěšná, dochází k výraznému snížení nákladů, např. při použití čtyř markerů v reakci pro fragmentační analýzu dojde ke snížení nákladů na čtvrtinu z původní ceny.

Softwarové vybavení pro základní vyhodnocení genetické vzdálenosti nevyžadují žádné specifikace. Dostatečný je klasický tabulkový editor a program vhodný pro výpočet podobnostní matice a provedení clusterové či PCoA analýzy.



## Publikace předcházející metodice

Čurn V., Jozová E., Rost M., Rychlá A., Stehlíková D. (2022): Analýza genetické struktury odrůd hořčice bílé pomocí Bayesovských metod modelování. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha, ISSN 0139-6013. s. 17-24

Stehlíková D., Jozová E., Čurn V. (2022): Stanovení diverzity genetických zdrojů hořčice na základě analýzy mikrosatelitů. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha, ISSN 0139- 6013. s. 99-106.

Jozová E., Čurn V., 2020. Hodnocení genetické diverzity genetických zdrojů hořčice pomocí mikrosatelitových markerů. *Úroda – vědecká příloha*, 2020: (12): 55-61

Jozová E., Rychlá A., Čurn V. (2021). Mikrosatelitové markery jako účinný nástroj pro hodnocení čistoty osiva. *Seed and Seedlings XV. Sborník referátů*. p: 31-37.

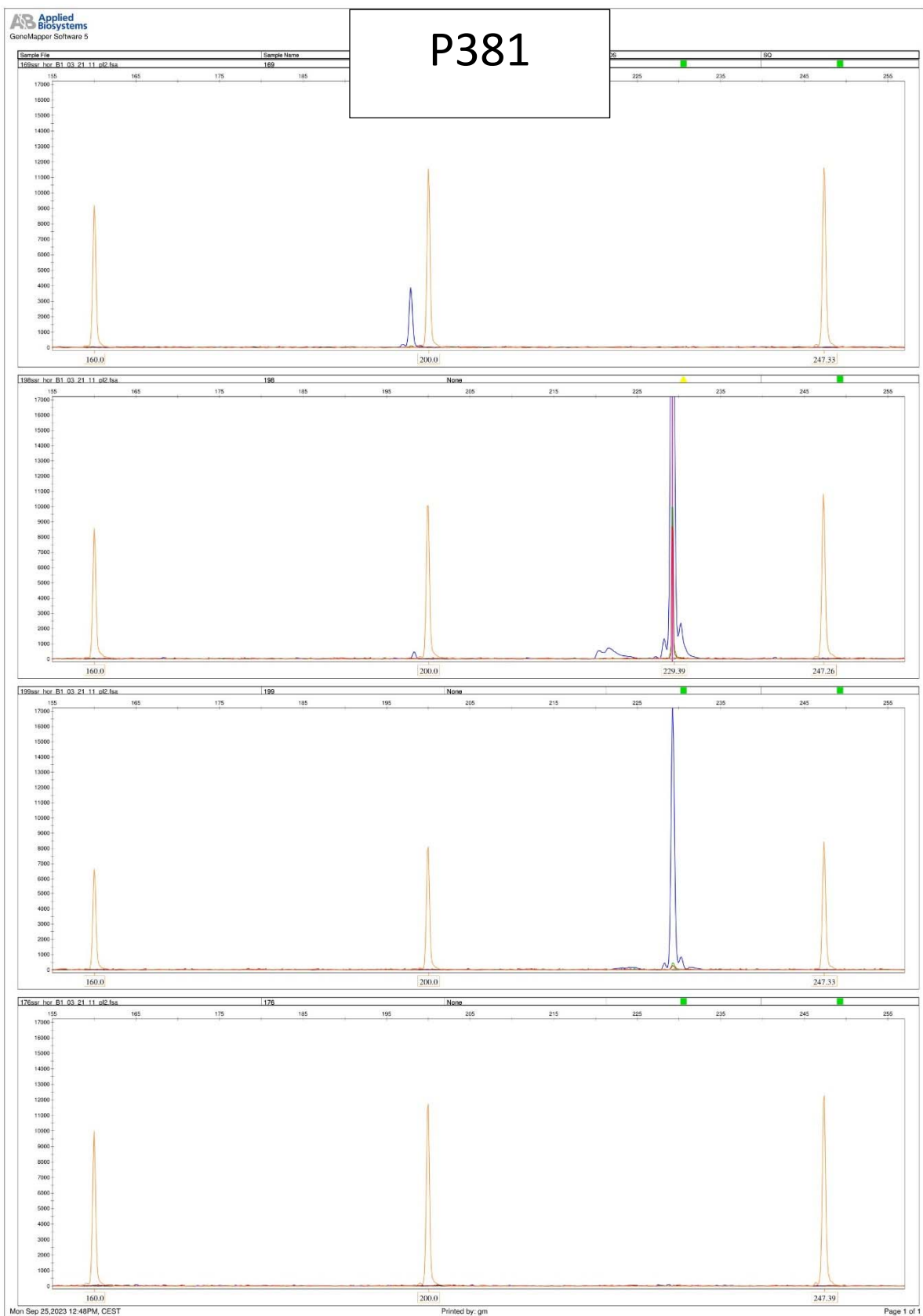
## Použitá literatura

- Ashkenazi V., Chani E., Lavi U., Levy D., Hiller J., Veilleux, E. (2001). Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44: 50-62.
- Baranyk, P. (2010). *Olejniný*. Profi press. Praha, s. 206, ISBN 978-80-8672-638-0
- Bell, C. J., Ecker, J. R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*, *Genomics*, 19: 137-144
- Bodnaryk R.P., Lamb R.J. (1991). Mechanisms of resistance to the flea beetle, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze), in mustard seedlings, *Sinapis alba* L, *Can. J. Plant Sci.* 71 (1991) 13–20. <https://doi.org/10.4141/cjps91-002>.
- Čurn, V., Havlíčková, L., Vondrášková, E., Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M. (2012). Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Doyle J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg
- Hanelt P.(ed.). (2001). *Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops*. 6 vols. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Vol. 3, pp. 1465–1469.
- Havlíčková L., Jozová E., Rychlá A., Klíma M., Kučera V., Čurn, V. (2014). Genetic diversity assesment in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers, *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50: (3): 216-225

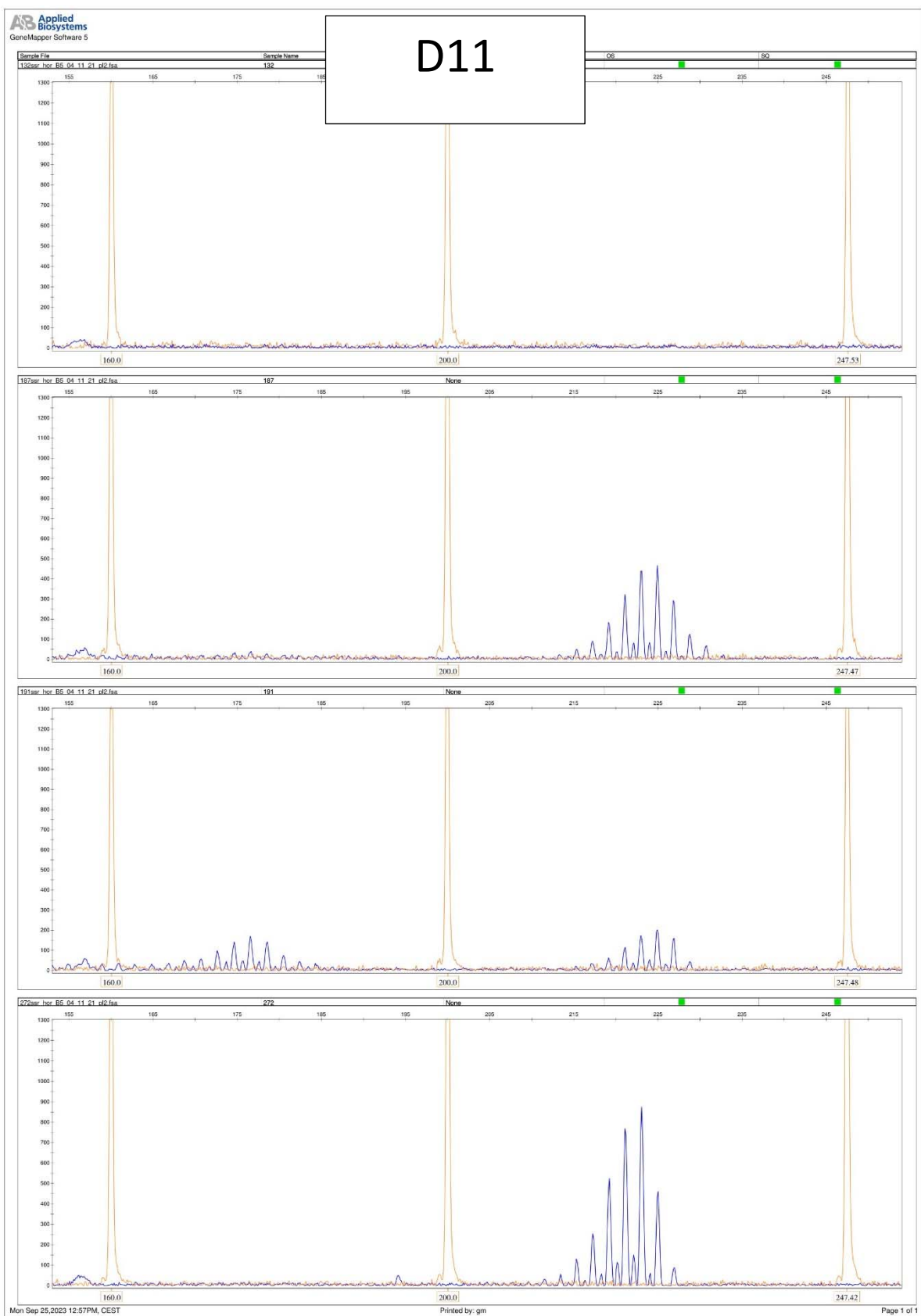
- Hemingway J.S. (1995). The mustard species: condiment and food ingredient use and potential as oilseed crops. In: Kimber, D., McGregor, D.I. (Eds.) *Brassica Oilseeds Production and Utilization*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 373–383.
- Iqbal, S., Hamim, I., Haque, S., & Nath, U. K. (2015). Genetic diversity analysis of mustard (*Brassica* spp.) germplasm using molecular marker for selection of short duration genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 14(17), 1439-1448.
- Kumari P., Singh K.P., Rai P.K. (2020). Draft genome of multiple resistance donor plant *Sinapis alba*: An insight into SSRs, annotations and phylogenetics, *PLoS One*, 15, e0231002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231002>.
- Masierowska M., Pietka T. (2014). Variability in nectar and pollen production in flowers of double–low lines of white mustard and their attractiveness to honey bees, *Acta Sci. Pol. Hortorum*. 13 197–209.
- Mikšík V., Zúkalová H., Prášilová M., Vašák J. (2007): *Hořčice. Pěstitelský rádce*. Kurent, České Budějovice.
- Raza, A. (2021). Eco-physiological and biochemical responses of rapeseed (*Brassica napus* L.) to abiotic stresses: consequences and mitigation strategies. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(4), 1368-1388.
- Ruan S. F., Wang Z.X., Xiang S.J., Chen H.J., Shen Q., Liu L., Wu W.F., Cao S.W., Wang Z.W., Yang Z.J., Weng L.D., Zhu H.X., Liu Q. (2019). Mechanisms of white mustard seed (*Sinapis alba* L.) volatile oils as transdermal penetration enhancers, *Fitoterapia*. 138 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104195>.
- Valdes Y., Viaene N., Perry R., Moens M. (2011). Effect of the green manures *Sinapis alba*, *Brassica napus* and *Raphanus sativus* on hatching of *Globodera rostochiensis*, *Nematology*. 13 965–975. <https://doi.org/10.1163/138855411X571803>.

## Příloha

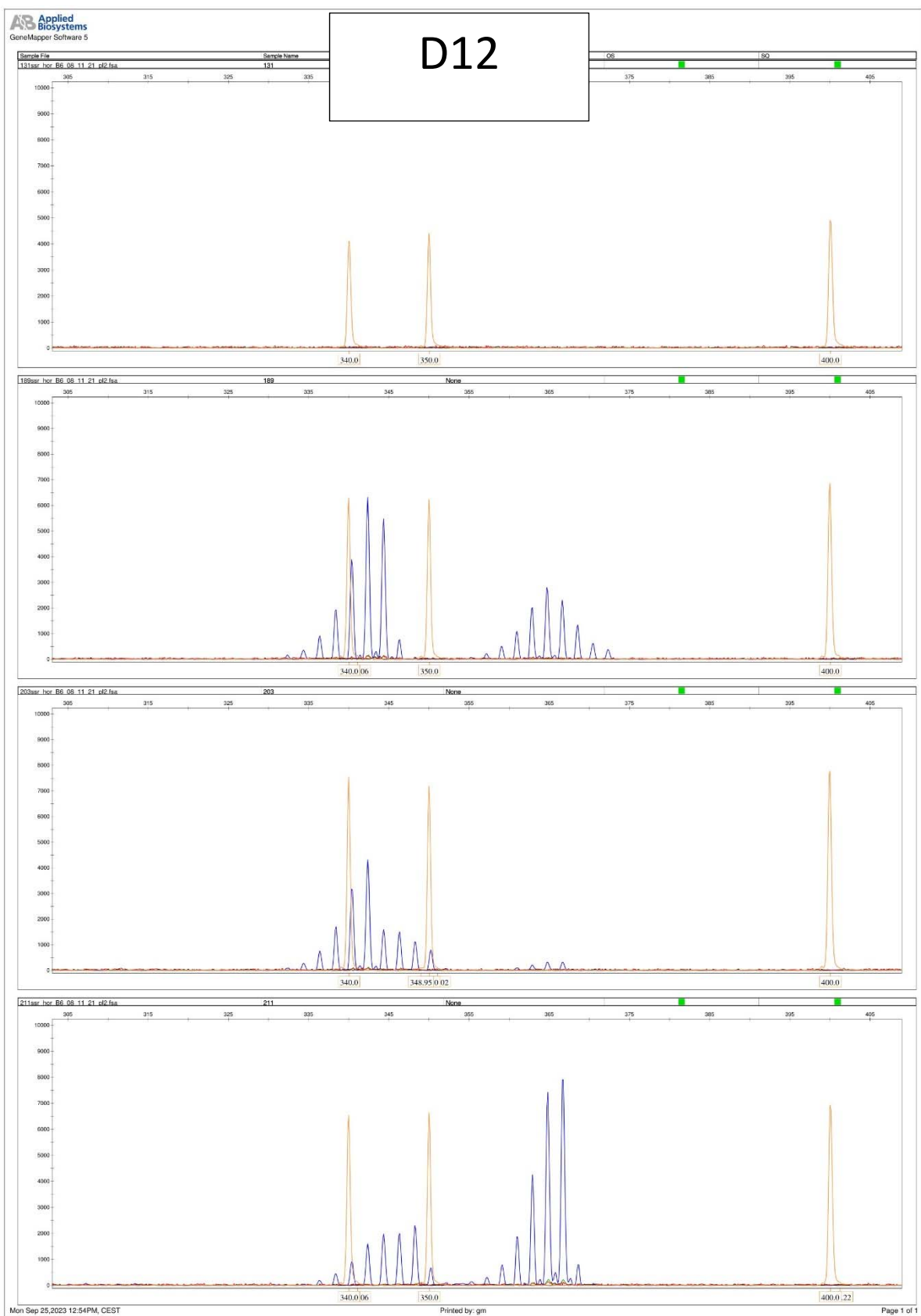
Obrazová příloha ukávek SSR markerů zobrazených pomocí fragmentační analýzy





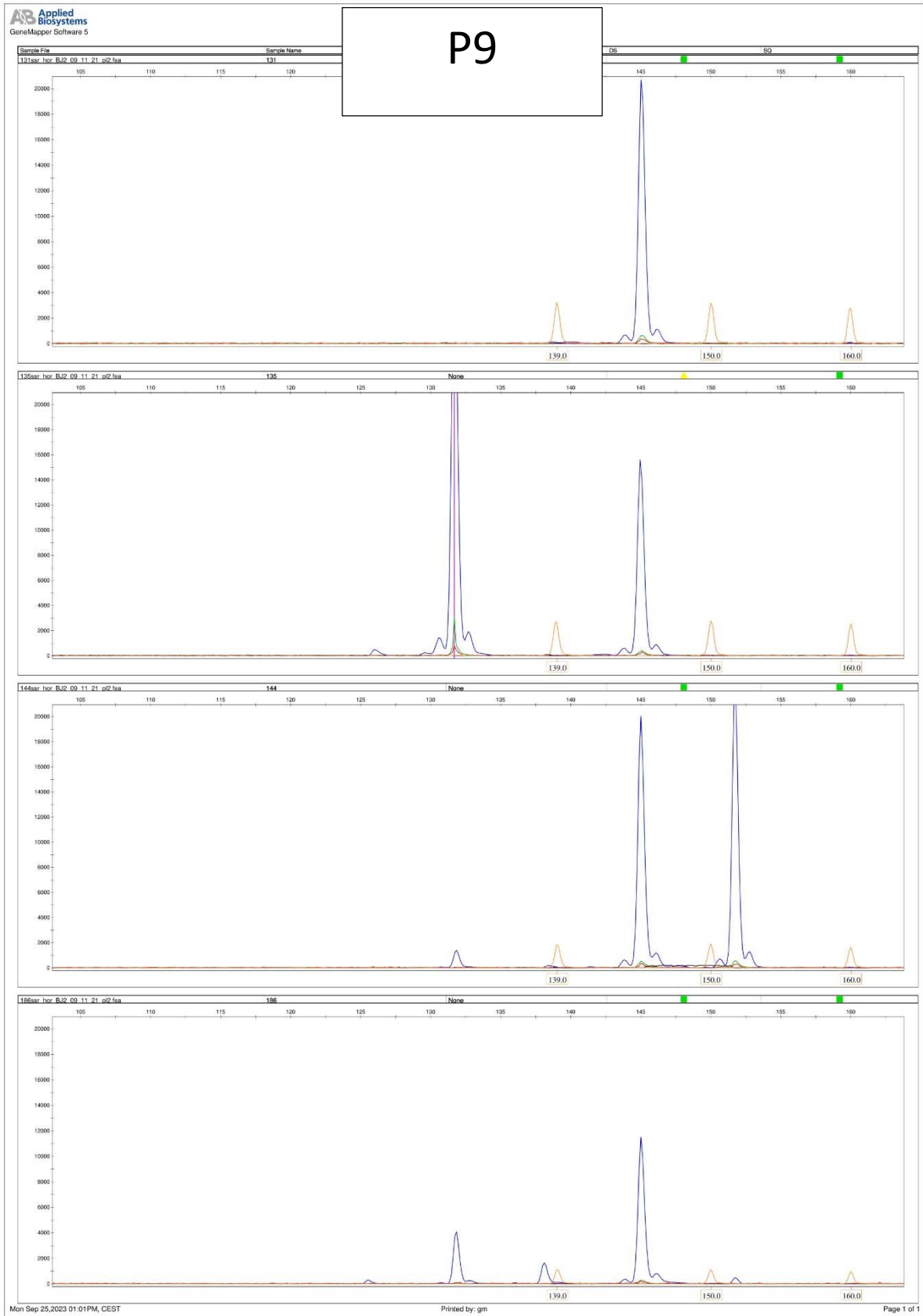


Jozová E., Čurn V. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diversity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie



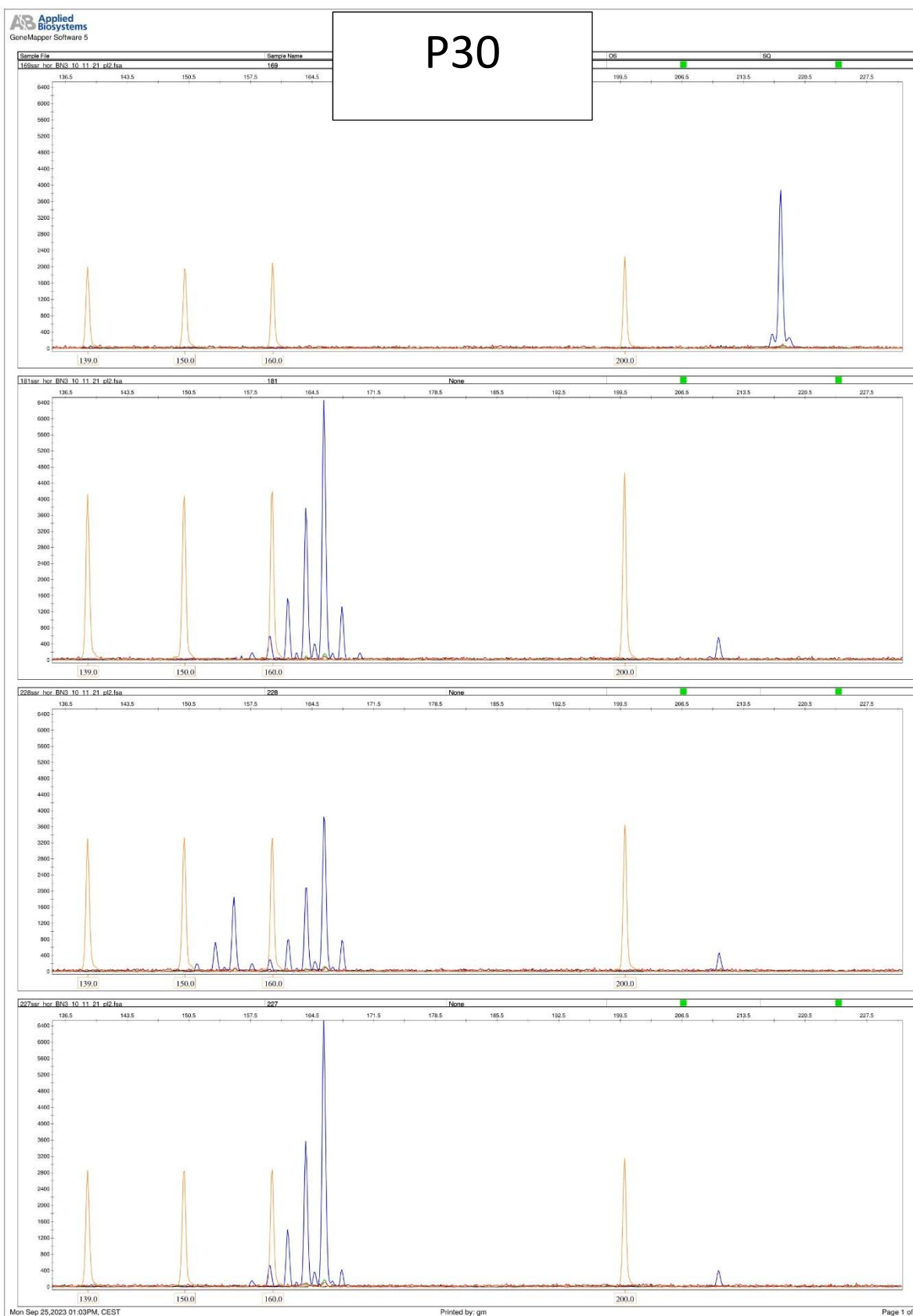


Jozová E., Čurn V. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diversity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie



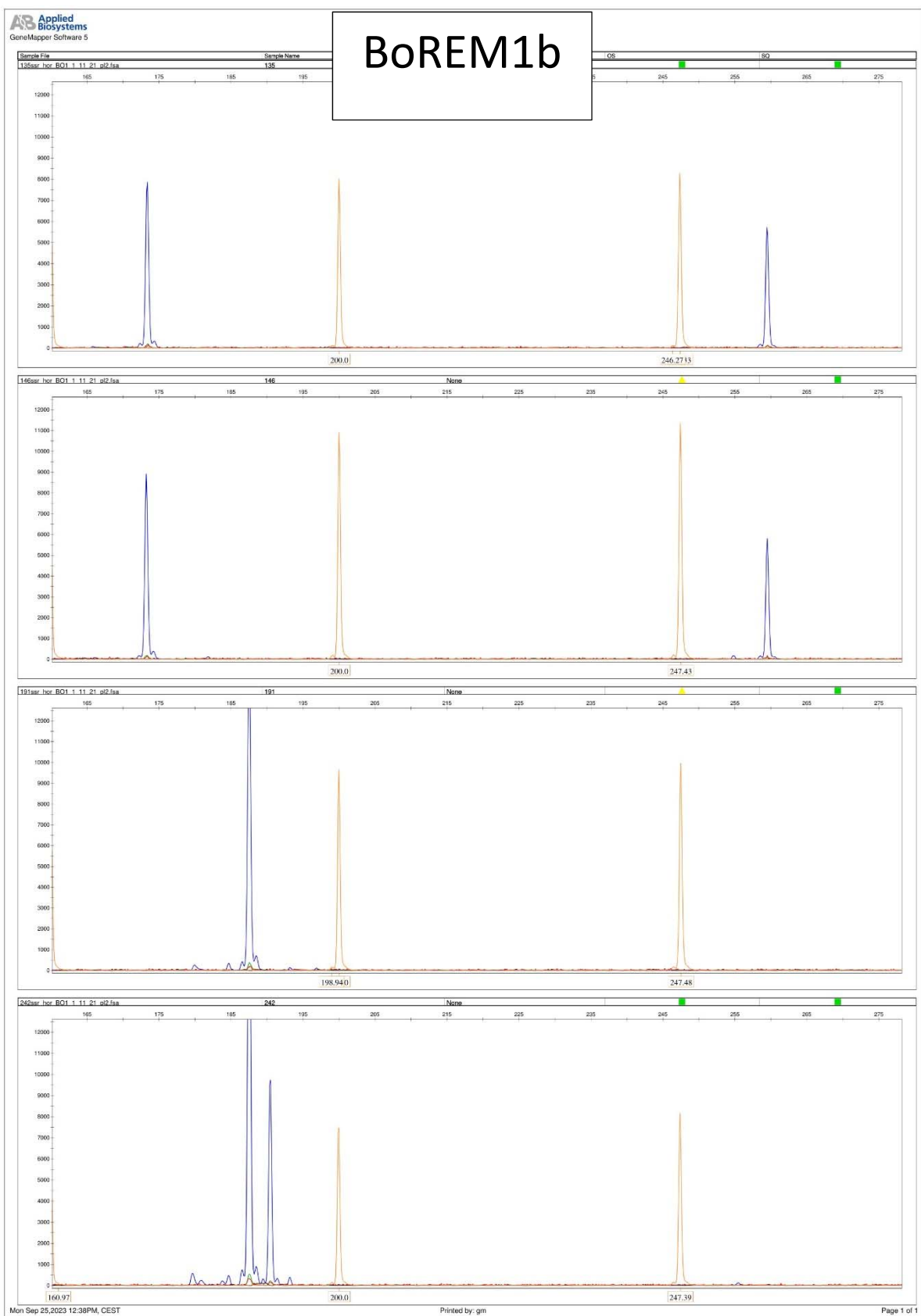


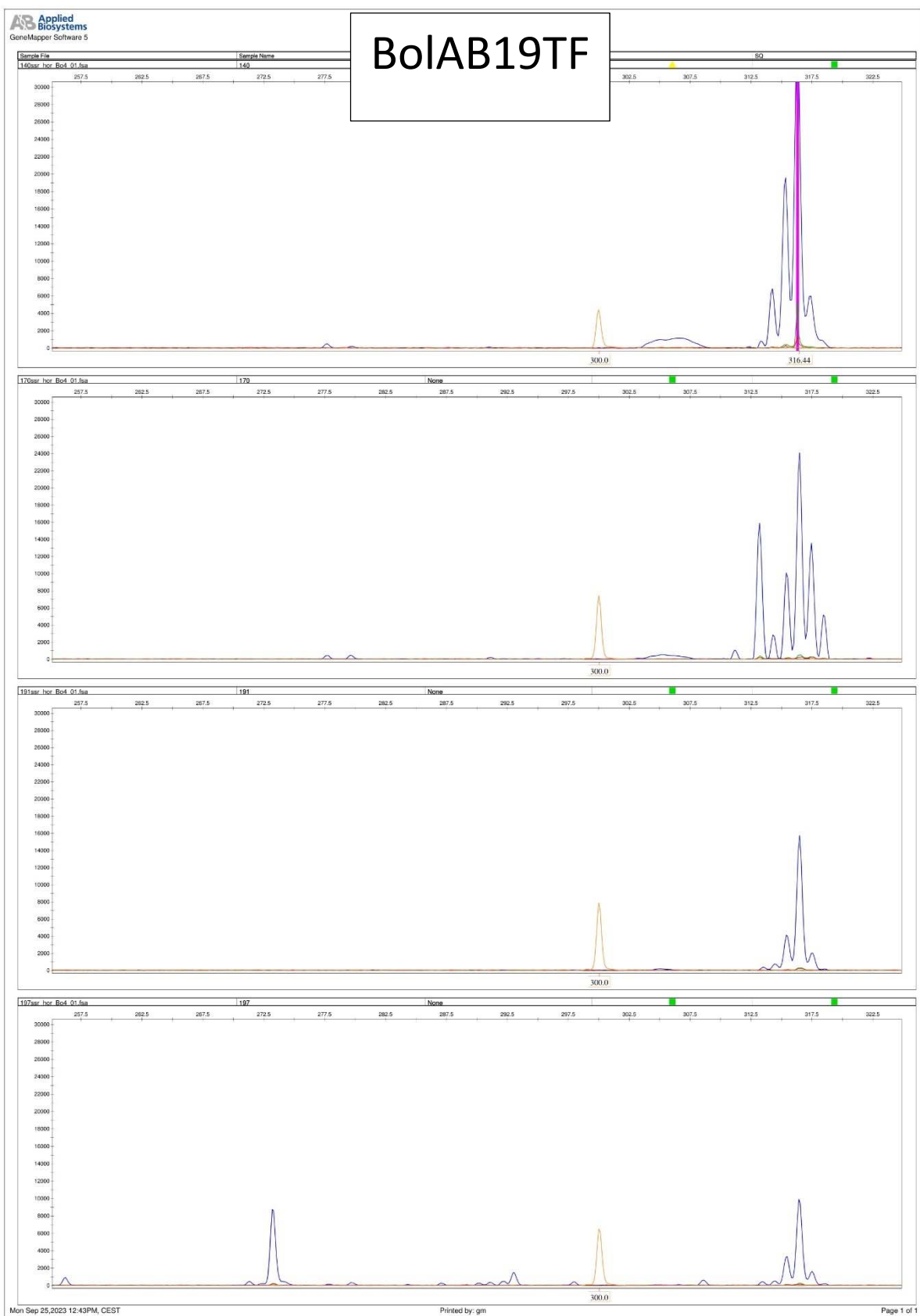
Jozová E., Čurn V. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diversity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie

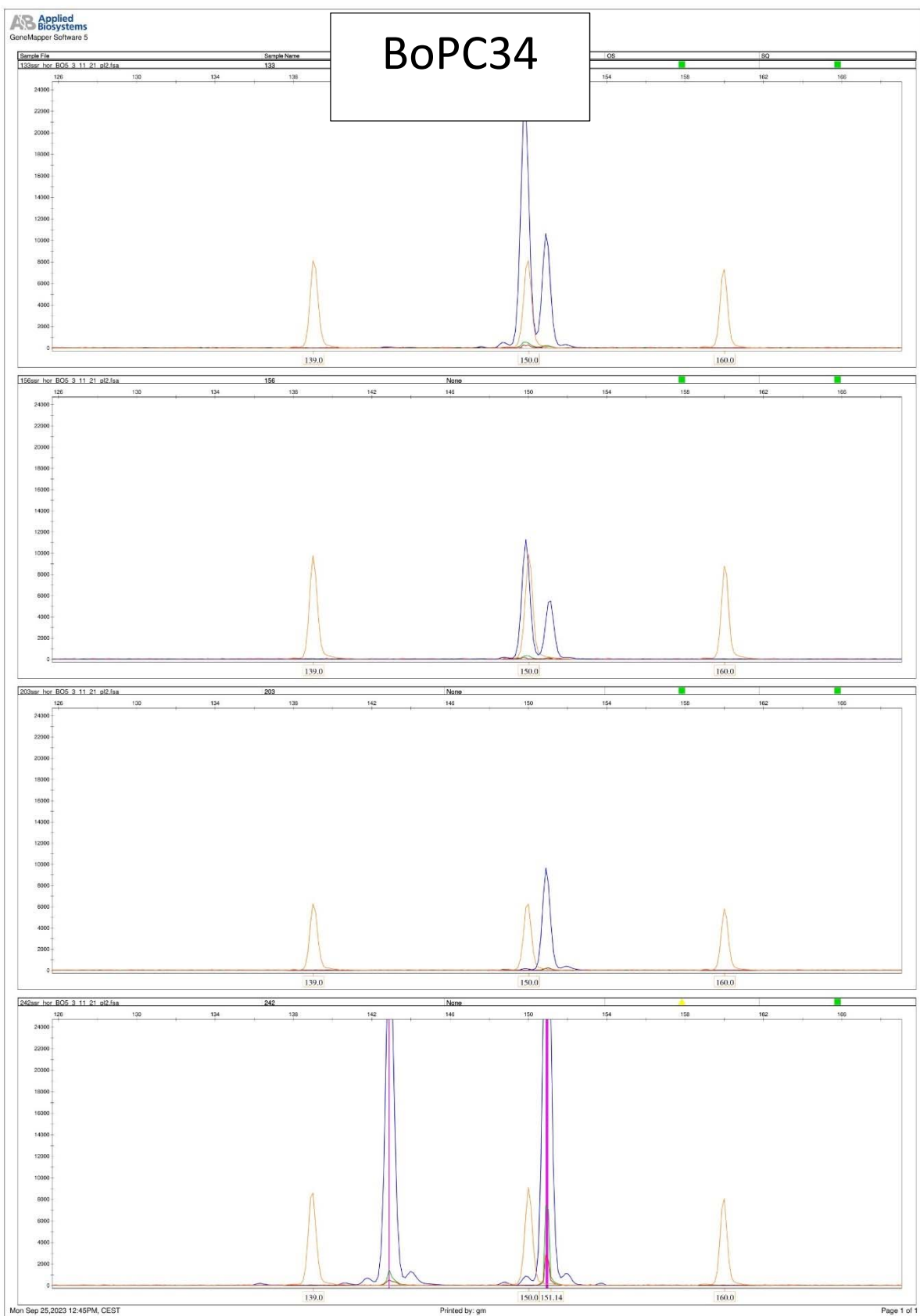


Jozová E., Čurn V. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diversity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie









## Použité roztoky

### roztoky pro izolaci DNA

#### 2x CTAB-PVP

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	2%	2 g	10 g	20 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
Tris	100mM	1,21 g	6,05 g	12,114 g	+HCl = pH 8-8,2
EDTA	20mM	0,75 g	3,723 g	7,446 g	+NaOH = pH 7,8-8
NaCl	1,4M	8,2 g	40,915 g	81,83 g	
PVP	1%	1 g	5 g	10 g	
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

#### 5% CTAB

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	5%	5 g	25 g	50 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
NaCl	0,35M	2,04 g	10,27 g	20,4 g	
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			

#### 1x TE pufr

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	10mM	0,121 g	0,605 g	1,2114 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C +HCl = pH 8-8,2
EDTA	1mM	0,03723 g	0,1865 g	0,3723 g	+NaOH = pH 7,8-8
dH <sub>2</sub> O		doplnit do požadovaného objemu			



Název: Jozová E. a kol. (2023): Optimalizovaná metodika stanovení diversity genetických zdrojů hořčic s využitím molekulární biologie

Autorský kolektiv: Ing. Eva Jozová, Ph.D.  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zemědělská a technologická  
Studentská 1668  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 21.12.2023 (č.j. MZE-74207/2023-13132; osvědčení č. UKZUZ 213660/2023), jako certifikovaná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [jozovae@fzt.jcu.cz](mailto:jozovae@fzt.jcu.cz)

ISBN: 978-80-7694-040-6

