

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Distribuce *S*-alel u rodu *Brassica*

Studijní program: Zemědělské inženýrství N 4101
Studijní obor: Živočišná biotechnologie

Vedoucí diplomové práce:
Prof. Doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor:
Bc. Václava Žaludová

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala na základě vlastních experimentálních výsledků, a s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 23.4. 2008

Děkuji Prof. Doc. Ing. Vladimíru Čurnovi, Ph.D., a Ing. Janě Žaludové, Ph.D. za trpělivost a ochotu při vedené této práce, a za poskytování cenných rad i během celé doby studia.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Aplikace molekulárních markerů u rodu <i>Brassica</i>	2
2.1.1. Mapování genomu pomocí molekulárních markerů	2
2.1.2. Kandidátní gen	3
2.1.3. Aplikace molekulárních markerů při zjišťování hybridnosti	3
2.1.4. Analýza genetické diverzity	4
2.1.5. Registrace odrůd	4
2.2. Aplikace molekulárních markerů ve šlechtění řepky	5
2.2.1. Pylová samčí sterilita	5
2.2.2. Autoinkompatibilita	6
2.2.3. Resistence k chorobám	7
2.2.4. Obsah oleje a jeho kvalita	7
2.2.5. Morfologické znaky	8
2.2.6. Abiotický stres	9
2.3. Autoinkompatibilita u rodu <i>Brassica</i>	11
2.4. Distribuce různých S-haplotypů	12
2.5. Molekulární markery autoinkompatibility	13
3. MATERIÁL A METODY	15
3.1. Materiál	15
3.2. Metody	15
3.2.1. Izolace genomové DNA (Invisorb Plant Mini Kit – Invitex)	15
3.2.2. Izolace plazmidové DNA (Invisorb Spin Plasmid Mini Kit – Invitex)	16
3.2.3. PCR genu <i>SLG</i> třídy II	16
3.2.4. Příprava agarózového gelu	17
3.2.5. Eluce fragmentů DNA z agarózového gelu (JETQUICK)	18
3.2.6. Klonování DNA (Topo TA cloning for sequencing kit – Invitrogen)	18
3.2.7. Restrikční štěpení	19
3.2.8. Sekvenační reakce (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit-Beckman Coulter)	19
3.2.9. Hodnocení sekvencí programem Bioedit	20
4. VÝSLEDKY	21
5. DISKUSE	27
6. ZÁVĚR	28
7. POUŽITÁ LITERATURA	29
8. POUŽITÉ ZKRATKY	39

1. ÚVOD

Řepka olejka patří k významným plodinám pěstovaným v České republice. Pro podporu šlechtění této plodiny vzniklo v roce 1997 sdružení Česká řepka, které seskupuje výzkumné organizace s cílem podpořit šlechtění domácích odrůd řepky založených na nejnovějších poznatcích vědy a výzkumu. Využití biotechnologických metod je především zaměřeno na vývoj markerů pro vybrané specifické znaky. Markérováním genu obnovy fertility u systému CMS Ogu-INRA bylo prokázáno, že spektra sterilních a fertálních linií jsou velmi dobře rozlišitelná. Vývojem molekulárních markerů pro selekci AI rostlin a genotypů rezistentních k houbové chorobě *Phoma lingam* se zabývá pracoviště Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity. Při tvorbě hybridních odrůd se využívá genetického mechanismu autosterility, jako jsou pylová samčí sterilita (CMS) a autoinkompatibilita. Při tvorbě odrůd je důležitá genová variabilita, kterou je možné posoudit pomocí molekulárních markerů. K posouzení této variability jsou vhodné dostatečně polymorfní molekulární markery nebo lze využít polymorfismu určitého genu. V této práci byl využit polymorfismus genu SLG, který se účastní autoinkompatibilní reakce při opylení vlastním pylem. Posuzovány byly nejenom linie řepky a odrůdy, ale také jiné druhy rodu *Brassica* a dokonce i *Raphanus sativus*. Variabilita mezi jednotlivými odrůdami a druhy byla posuzována společně s variabilitou dvou tříd genů *SLG*, *SLG* třídy I. a II. Cílem této práce bylo posouzení variability u řepky s ohledem na polymorfismus genu *SLG* a hledání rozdílů mezi autoinkompatibilními a autokompatibilními typy rostlin.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Aplikace molekulárních markerů u rodu *Brassica*

2.1.1. Mapování genomu pomocí molekulárních markerů

Genetické vazebné mapy jsou základním nástrojem pro vývoj molekulárních markerů, které jsou spojeny s důležitými agronomickými znaky u *Brassica napus*. Podrobné mapy mohou být vytvořeny pomocí různých molekulárních markerů, které jsou společně posuzovány. Mnohonásobně segregující populace umožňují mapování velkého množství lokusu tak, že poskytují větší množství potenciálně využitelných markerů na různých genetických pozadích (Piquemal et al, 2005). Většina hustých vazebných map založených na RFLP byla vytvořena pro *Brassica napus* (Landry et al. 1991; Ferreira et al. 1994; Uzunova et al. 1995). Za několik let bylo vyvinuto a aplikováno u rostlin, včetně *Brassica napus*, množství nových markerů založených na PCR technologii jako je RAPD, AFLP a mikrosatelity. SSR markery jsou většinou odvozeny z *Brassica rapa*, *B.nigra*, *B. oleracea* a *Arabidopsis thaliana*.

Dalším způsobem identifikace markerů spojených s různými znaky, odhalováním genů nebo QTL je komparativní mapování za účelem vytvoření consensus genetických markerů, tzn. takových markerů, které fungují u blízce příbuzných druhů. Dobře prostudovaná rostlinná fyziologie a známé genetické pozadí *A. thaliana* je příležitostí pro lepší pochopení rodu *Brassicaceae*, jež je ve stejné čeledi. Přímým sekvenováním PCR produktů, které byly amplifikovány pomocí degenerovaných primerů, byly získány sekvence šesti lokusů *A. thaliana* (Brunel et al. 1999). Komparativní mapování druhů *Brassica* bylo provedeno u *B. oleracea* z *B. rapa* a *B. napus* (Teutonico and Osborn 1994), u *B. oleracea* s *B. napus* (Cheung et al. 1997), a u syntetické *B. napus*, *B. oleracea* a *B.rapa*. (Lyndiate et al. 1993).

Analýza segregujících *B. napus* pomocí molekulárních markerů ukazuje na homologní výměny jako je, homologní nereciproká translokace (Sharpe et al. 1995, Parkin et al. 1995) nebo homologní reciproká transpozice (Osborn et al. 2003). Chromozomální přestavby způsobené homologními rekombinacemi se zdají být u *B. napus* hojně rozšířené. Předpokládá se, že existuje vliv chromozomální přestavby na alelickou nebo fenotypovou diverzitu (Udall et al. 2005).

U *B. napus* bylo publikováno mnoho genetických map založených na jednoduchých populacích (Landry et al. 1991; Ferreira et al. 1994; Parkin et al. 1995; Sharp et al. 1995;

Uzunova et al. 1995; Foisset et al. 1996; Cheung et al. 1997). Genetické mapy založené na mnohočetných populacích byly vytvořeny tak, aby pokryly celý genom řepky. Parkin and Lydiate (1997) vytvořili integrovanou mapu pomocí dvou populací s třemi různými rodiči. Lombard and Delourme (2001) použili tři populace ke zkonstruování mapy pomocí RFLP, AFLP nebo RAPD markerů. Také Udall et al. (2005) sestavil RFLP mapy ze čtyř nezávislých mapovacích populací. Genetické mapy jsou většinou používány k lokalizování genů, QTL spojených s různými agronomickými znaky, také transgeny (Baranger et al. 1997) anebo mezidruhových introgresí (Barret et al. 1998a; Delourme et al. 1998).

2.1.2. Kandidátní geny

Amplifikované genové consensus markery (Amplified Consensus Gene Marker ACGM) jsou vyvíjeny sekvenováním homologních genů z různých druhů, ale v rámci stejné čeledi, a detekcí polymorfismu uvnitř genu. Neustálé nové poznatky o rostlinné fyziologii a genetickém podkladu z projektů s *A. thaliana* přinášejí nové možnosti aplikace těchto poznatků u rodu *Brassica*, který patří do stejné čeledi (*Brassicaceae*). Byly vytvořené ACGM markery, které amplifikují sekvence genů z *A. thaliana* a *B. napus* (Brunel et al. 1999, Fourmann et al. 2002). Za účelem nalezení příslušného kandidátního genu byly také použity EST markery (Expressed Sequence Tag). ESTs *A. thaliana* z homologií ke klonovaným rostlinným genům byly použity pro hledání genů rezistence k chorobám.

2.1.3. Aplikace molekulárních markerů při zjišťování hybridnosti

Hybridní odrůdy řepky jsou úspěšně používány v zemědělské praxi pro jejich zvýšený výnos. Jedna z nejpoužívanějších aplikací molekulárních markerů je kontrola čistoty osiva u hybridních odrůd (Marshall et al. 1994). Frekvence hybridizace a introgrese mezi domestikovanou *B. napus* a divokými příbuznými je hodnocena jako potencionální riziko úniku transgenů s geneticky modifikované řepky do populací příbuzných plevelů. Introgrese ve smíšených populacích plevelné řepky a příbuzné *B. rapa* byla zkoumána pomocí místně-specifických AFLP markerů (Hansen et al. 2001). Další postup introgrese byl studován na potomstvu z mateřských rostlin z introgresní populace se stejnými AFLP markery a místně-specifickými chloroplastovými markery (Hansen et al. 2003). Stupeň hybridizace byl také posuzován pomocí SSR-PCR a primerově-specifických markerů buď pro C nebo pro A genom potomstva z křížení *B. napus* a *B. rapa* (Pallett et al. 2006). Mikkelsen et al. (1996)

ověřil mezidruhovou hybridizaci potomstev *B. napus* zkřížené s *B. campestris* a zpětně zkříženého s *B. campestris* pomocí *B. napus*-specifických RAPD markerů. Specifické markery pro *B. napus* byly amplifikovány pro určení hybridizace mezi *B. juncea* a *B. napus* hybridů s *B. juncea* jako mateřskou rostlinou (Frello et al. 1995).

2.1.4. Analýza genetické diverzity

Řepka olejka je jednou z nejdůležitějších olejnin a intenzivní šlechtění vedlo k zúžení genetického základu u současného genetického materiálu. Genový pool elitních šlechtitelských materiálů byl výrazně redukován selekcí určitých kvalitativních znaků. Jako důsledek je genetická variabilita omezena s ohledem na mnoho jakostních parametrů využívaných pro šlechtitelské účely. Halldén et al. (1994) porovnával šlechtitelské linie *B. napus* pomocí RFLP a RAPD markerů, zatímco Diers and Osborn (1994) porovnával RFLP spektra u 61 ozimých a jarních genotypů řepky a došel k závěru, že tyto dvě formy vytvářejí dvě geneticky rozdílné skupiny. Analýza pomocí molekulárních markerů potvrdila, že ozimé a jarní genotypy řepky vytvářejí dvě geneticky rozlišné skupiny (Becker et al. 1995, Diers et al. 1996). Seyis et al. (2003) popsal genetickou diverzitu na sadě resyntetizovaných linií řepky a odrůdách jarní řepky. Hasan et al. (2005) použil publikované SSR markery pocházející z genomu *B. napus*, aby charakterizoval sadu 96 selektovaných genotypů ze základní kolekce řepky odvozené z materiálů Evropské genové banky. Tento materiál byl rozdělen do čtyř hlavních skupin: jarní řepka a píče, ozimá řepka, ozimá píče a genotypy zeleniny. Molekulárně-genetické informace umožňují identifikovat genetickou variabilitu vhodnou pro šlechtění řepky a potenciálně zajímavou s ohledem na zvyšující se heterozii u hybridů řepky.

2.1.5. Registrace odrůd

Současný systém testování nových odrůd řepky je založen na posuzování širokého spektra standardních morfologických vlastností, což je nákladné a zdlouhavé. Každá potenciální nová odrůda musí vykazovat odlišnost od ostatních známých odrůd, uniformitu znaku a stálost zkoušených znaků. Halldén et al. (1994) použil RFLP markery k porovnání třech šlechtitelských linií *B. napus*, a zjistil, že minimální počet prób nebo kombinací enzymů k bezpečnému rozlišení těchto linií je 30. Tento přístup vyžaduje relativně velké množství DNA od každého vzorku a dále pak hledání vhodných prób nebo enzymových kombinací, což je časově náročné. Na rozdíl od RFLP je RAPD analýza jednoduchá, rychlá a konvenční

stanovení vyžaduje menší množství templátové DNA. RAPD markery byly úspěšně aplikovány u identifikace odrůd *B. napus* a *B. rapa*, nicméně nalezení stabilního polymorfního RAPD markeru je obtížné (Mailer et al. 1994). Mezi dostupnými technikami DNA molekulárních markerů je nejučtenější identifikace odrůd pomocí AFLP (Powell et al. 1996). V porovnání s RFLP jehož polymorfismus mezi odrůdami je nízký (Diers and Osborn 1994), AFLP má velmi příznivé parametry pro DUS testování odrůd Lombard et al. (2000) hodnotil rozlišovací schopnost 17 AFLP primerových kombinací testovaných na kolekci 83 jarních a ozimých odrůd řepky. Již dvě primerové kombinace účinně rozlišily všechny odrůdy. Pro srovnání směsných vzorků DNA z různých odrůd *B. napus* a *B. rapa* byly při PCR analýzách použity primery komplementární k SSR s variabilní třibazovou 'kotvou' na 5' konci. SSR-PCR analýza používající tyto 'kotvy' je vysoce informativní a reprodukovatelná metoda pro fingerprinting populací řepky. Nicméně existuje také polymorfismus uvnitř odrůdy, který je značně rozdílný mezi odrůdami. Vnitroodrůdová variabilita může být zkoumána ještě předtím, než je vytvořen směsný vzorek z jednotlivých individuí (Charters et al. 1996). Tři sady multiplex SSR markerů, každá složená z pěti markerů, byly použity ke zjišťování rozsahu diverzity uvnitř a mezi deseti odrůdami. Významná je korelace mezi SSR markery, potomstvím a pěti z morfologických znaků současně používaných pro zákonem stanovené DUS testování odrůd. Odrůdy byly rozděleny do tří skupin, které odpovídaly ozimé, jarní a krmnému typu řepky. Z těchto výsledků je patrné, že SSR markery mohou být použity pro pre-screening nebo rozdělení do skupin existujících nebo kandidátských odrůd. Umožní tak zmenšit počet pěstovaných odrůd určených k porovnání (Tommasini et al. 2003).

2.2. Aplikace molekulárních markerů ve šlechtění řepky

2.2.1. Pylová samčí sterilita

Existuje několik způsobů hybridního šlechtění druhů *Brassica*, které zahrnují samčí cytoplazmatickou sterilitu (CMS), samčí jadernou sterilitu (GMS), autoinkompatibilitu (AI) a chemické hybridizační agens (CHA).

Jsou dva druhy GMS, a to dominantní samčí jaderná sterilita (DGMS) (Li et al. 1985, 1990) a recesivní samčí jaderná sterilita (Hou et al. 1990, Li et al. 1993, Tu et al. 1997). Sterilita u DGMS linií je podmíněna interakcí dvou genů, tzn. dominantního jaderného genu pro samčí sterilitu (*Ms*) a supresorového genu (*Rf*) (Li et al. 1988). Lu et al. (2004) aplikoval metodu AFLP k identifikaci MS lokusu. Také Song et al. (2006) našel AFLP markery těsně

spojené s alelou samčí sterility *Ms* a navíc vyvinul SCAR marker, který je pro obnovitelskou alelu *Rf*.

Ke et al. (2005) podrobil AFLP analýze dvojtypovou linií s recesivní epistatickou jadernou samčí sterilitou, kde je sterilita kontrolována dvěma páry duplikovaných recesivních genů sterility (*ms1* a *ms2*), které interagují s jedním párem recesivního epistatického genu pro inhibitor (*rf*). Sedm markerů bylo těsně spojeno s jedním recesivním genem pro jadernou samčí sterilitu (*ms*).

Cytoplasmatická samčí sterilita (CMS) je často kontrolována geny jádra a mitochondrií, které mohou být potlačeny specifickými jadernými geny nazývanými se obnovitelé fertility (Hanson 1991). Čtyři hlavní zdroje CMS u *B. napus* jsou: *nap*, *ogu*, *pol* a *tour* cytoplasmatické geny (Fu and Yang 1998). Jean et al. (1997) identifikoval vazebnou skupinu obsahující lokus *rfp1* obnovitele pro cytoplasmatický gen *pol* u odrůdy Polima (Fu 1981).

CMS, původně nalezená u ředkve (*Raphanus sativus* L.) Ogurou (1968), byla přenesena do *B. napus* mezidruhovým křížením (Bannerot et al. 1974). Delourme et al. (1994) provedl shlukovou segreganční analýzu pomocí RAPD markerů spojených s genem obnovy (*Rfo*) používaným u 'Ogury', cytoplasmatické sterility pocházející z ředkve. DNA marker byl spojený s genem obnovy pomocí fragmentů polymorfni DNA, která označovala buď s alelu obnovitele fertility nebo alelu udržovatele sterility. Údaje z analýzy RAPD markerů byly použity při MAS u F_2 pocházející z jednoduchého křížení mezi samičím rodičem homozygótním pro alelu obnovitele, nesoucím Ogura sterilní cytoplasmu a samičím rodičem homozygótním pro neobnovující alelu s normální cytoplasmou (Hansen et al. 1997). K mapování *Rfo* obnovitele používaného v systému Ogu-INRA cytoplasmatické samčí sterility byla použita shluková segreganční analýza a komparativní mapování a závěrem bylo, že vnesení CMS z ředkve do genomu řepky proběhlo pomocí homologní rekombinace (Delourme et al. 1998).

2.2.2. Autoinkompatibilita

Autoinkompatibilita je důležitý mechanismus přenosu genů pomocí cizosprašení u mnoha druhů kvetoucích rostlin. Nejvíce aplikovanou metodou určování *S* (sterility) haplotypů je polymerázová řetězová reakce délkového polymorphismu restričních fragmentů (PCR-RFLP), která je používána pro analýzu polymorfismu tří hlavních *S*-genů, *SLG*, *SRK* a *SCR*, ležících na *S*-lokusu. Podrobně bude tato problematika rozvedena v kapitole 2.5.

2.2.3. Resistence k chorobám

Fómová hniloba způsobená bakterií *Leptosphaeria maculans* je jednou z nejrozšířenějších chorob řepky olejky. Vnesení genů rezistence do řepky bylo provedeno pomocí křížení nebo asymetrické fúze protoplastů. Přítomnost genů rezistence v mezidruhových hybridech byla detekována pomocí metody RAPD (Chevre et al., 1997) nebo RFLP (Plieske et al., 1998). Pilet et al. (2001) odvodil genetickou mapu z dihaploidní populace vytvořené křížením rezistentních a náchylných odrůd řepky. Vytvořil genetickou mapu pomocí RAPD a RFLP. Odlišné genetické pozadí a rozdílná manifestace stupňů onemocnění měla za následek nesrovnalosti mezi různými populacemi. Plieske and Struss (2001) vytvořili z RFLP a RAPD markerů, které byly spojeny z B-genomem na němž leží rezistence proti fómě, STS markery, které je možno použít v MAS při zpětném křížení introdukovaných znaků do *B. napus*. Geny rezistence pocházející s odrůdy 'Darmor' byly mapovány ve dvou genomických oblastech, LG 10 a LG 16 vazebných skupinách (Delourme et al. 2004).

Virus mozaiky vodnice (TuMV) patří mezi největší skupinu virů infikující plodiny rodu *Brassica*. TuRB01 gen je dominantní gen, který nese silnou resistenci k některým izolátům TuMV u *B. napus*. V RFLP vazebné mapě byl tento gen lokalizován ve vazebné skupině N6 v genomu A *B. napus*, což naznačuje, že tento gen pravděpodobně pochází z *B. rapa* (Walsh et al. 1999). S lokusem rezistence pojmenovaným TuRB03 byl spojen 1 AFLP a 6 SSR markerů a tyto byly zmapovány ve stejné oblasti na chromozomu N6, stejně tak jako předchozí gen rezistence TuMV, gen *TuRB01* (Hughes et al. 2003).

Geny rezistence viru žluté mozaiky vodnice, který způsobuje znatelně snížený výnos úrody byly mapovány pomocí AFLP markerů a nalezen byl také 1 QTL, který vysvětluje až 50% fenotypové variability (Dreyer et al. 2001).

2.2.4. Obsah oleje a jeho kvalita

Genetické založení obsahu kyseliny linolenové u řepky bylo zatím publikováno jako 3 pomocné lokusy (Chen and Beversdorf 1990) působící v cytoplasmě (Rajcan et al. 2002) a 5 QTL založených na molekulárním mapování (Burns et al. 2003). Genetická kontrola obsahu k. olejové u *B. napus* byla popsána jako 4 QTL (Burns et al. 2003).

Ecke et al. (1995) použil F_1 DH populaci odvozenou z mikroskopů pro analýzu distribuce k. erukové a obsahu oleje v semeni. Tři různé vazebné skupiny představovaly tři QTL pro obsah oleje v semeni. Dvě QTL pro obsah oleje vykazovaly úzkou spjitost ke dvěma genům pro k. erukovou. Rajcan et al. (1999) našel RAPD marker úzce spojený s obsahem k. erukové a obsahem oleje. Pomocí degenerovaných PCR primerů vytvořených na *Arabidopsis* a *FAE1* sekvencí z řepky byly amplifikovány dva geny *BN-FAE1.1* a *BN-FAE1.2* z *B. napus*, odpovídajícím genům pro rodičovské druhy *B. rapa* a *B. oleracea*. Tyto dva geny jsou považovány za společně segregující s lokusy *E1* a *E2*, které kontrolují obsah k. erukové (Fourmann et al. 1998). *FAE* geny byly klonovány z *B. campestris* a *B. oleracea* a jejich působení na obsah k. erukové byl popsán (Das et al. 2003).

Tanhuanpää et al. (1995) objevil jeden RAPD marker označující gen, který působí na obsah k. linolenové stejně jako Hu et al. (1995). Jourden et al. (1996) identifikoval dvě vazebné skupiny ze 6 RAPD markerů, které odpovídaly dvěma QTL lokusům spojených s nízkým obsahem k. linolenové. Somers et al. (1998) identifikoval RAPD markery spojené s lokusy kontrolující desaturaci k. linolové a alelu genu *fad3* blízko jednoho z identifikovaných QTL lokusů. Hu et al. (1999) také našel dva RAPD markery pro obsah kys. linolové a linolenové, navíc vyvinul kodominantní SCAR marker pro nízký a vysoký obsah kyseliny linolenové. Schierholt et al. (2000) zmapoval tři AFLP markery spojené s mutacemi pro vysoký obsah oleje, které jsou lokalizovány blízko lokusu s jednou kopií genu *fad2*. Hu et al. (2006) navrhl dva SNP markery odpovídající mutacím *fad2* a *fad3c* genu. Javidfar et al. (2006) použil techniky RAPD a ISSR pro vývoj molekulárního markeru genu kontrolující obsah k. olejové a linolenové. Nelezené markery byly převedené na SCAR markery a použity ve šlechtění.

2.2.5. Morfologické znaky

Všechny současně pěstované odrůdy *B. napus* jsou černosemenné, nicméně vývoj žlutosemenné formy nabízí prostředek k upravení kvality canoly redukcí obsahu vlákniny a zvýšením obsahu proteinů (Shirzadegan and Röbbelen 1985). Černá semena v porovnání se žlutými mají výrazně tenčí obalové vrstvy proto vedou ke snížení slupky v semeni a následně zvýšení obsahu oleje (Stringam et al. 1974). Některé další výhody žlutosemenných řepok zahrnují např. více čirý olej, vyšší obsah proteinů, vyšší obsah vlákniny a lepší výživnou hodnotu pro dobytek (Tang et al. 1997; Meng et al. 1998). Somers et al. (2001) analyzoval DH populaci odvozenou s F_1 generace po křížení 'Apollo' (černosemenná) × YN90-1016

(žlutosemenná) *Brassica napus*. Major gen (*pigment 1*) ohraničený 8 RAPD markery kosegreguje se znakem žlutosemennosti v populaci vysvětluje více než 72% fenotypové variability žluté barvy semenných obalů. Objevené byly dva aditivní geny, o kterých se uvažuje, že je mezi nimi a lokusem *pigment 1* dominantní epistatická interakce. Zhi-wen et al. (2005) objevil, že barva semene je kontrolována mateřským genotypem a žlutosemenatost je částečně dominantní nad černošemenatostí. Segregační analýza odhalila jednoduchý lokus genů pro částečnou dominanci nad černošemenatostí. Dva RAPD markery a 5 AFLP markerů byly nalezeny ve spojitosti s alelou pro žlutosemenatost, zatímco tři AFLP markery byly spojeny s alelou pro černošemenatost.

Délka šesule je důležitý parametr v hodnocení celkové sklizně řepky. Hawkins et al. (2005) přišel na to, že znak pro dlouhé šesule je řízen dvěma nezávislými geny v dominantně-recesivním vztahu a s aditivními účinky. Byly nalezeny dvě vazebné skupiny, které segregují se znakem dlouhých šesulí.

Také znak zakrslosti je důležitý při posuzování úrovně rezistence poléhání, což má vliv na výši výnosu. Genetická analýza zakrslosti odhalila, že tento znak je řízen mutovaným genem (*Bzh*) s aditivními účinky. Obtíže se objevovaly vždy při správném určování homozygótních (*dwarf*; *bzh/bzh*) a heterozygótních (*semidwarf*; *Bzh/bzh*) rostlin ve štěpícím potomstvu. Za účelem překonání těchto potíží bylo iniciováno molekulární mapování *dwarf* lokusu. Zkonstruována byla tady vazební mapa v okolí genu *Bzh*, nejbližší marker byl pojmenován OPM07-730 a byl ve vazbě 0.8 ± 0.7 cM (Foisset et al. 1995). Pro získání specifického kodominantního markeru založeného na PCR Barret et al. (1998b) vytvořil SCAR marker z markeru OPM07-730.

2.2.6. Abiotický stres

Odolnost k přezimování je jedna z důležitých vlastností řepky, a uvažuje se, že je ovlivňována genetickou variabilitou znaků, které jsou regulovány chladem, jako je např. tolerance k mrazu nebo čas potřebný k jarovizaci. V souladu s pozicemi QTL na mapě, které řídí různé znaky v rámci druhu byly získány důkazy, že některé alely poskytují větší toleranci (Kole et al. 2002). Další mapovaný znak je schopnost využívat efektivně bór. Využitelnost bóru řídí major gen, který byl zmapován v 9. vazebné skupině *B. napus*. Zároveň byly detekovány tři minor lokusy, a tři vazebné skupiny (Xu et al. 2001).

Tabulkový přehled

Následující tabulka shrnuje využití molekulárních markerů důležitých agronomických znaků *B. napus*

Tab. 1. Příklady některých důležitých znaků u druhů *Brassica* kde byly použity genetické markery ke zmapování lokusů nebo klonování genů.

Typ znaků	Specifický znak	Molekulární markery	Vybrané citace	
Morfologické znaky	Délka šesulí	RAPD	Hawkins et al. 2005	
	Výška rostliny (dwarf locus)	SCAR	Barret et al. 1998	
			Foisset et al. 1995	
	Barva semene	RAPD	Somers et al. 2001	
		RAPD, AFLP	Zhi-wen et al. 2005	
	Doba kvetení		Ferreira et al. 1995c	
	Květy se sníženým počtem okvětních lístků		Fray et al. 1997	
Rezistence k chorobám	Phómová choroba (<i>Leptosphaeria maculans</i>)	RAPD	Delourme et al. 2004	
		RAPD	Chevre et al. 1997	
		RAPD, RFLP	Plieske et al. 1998	
		SCAR, RGA (resistance gene analog)	Saal and Struss 2005	
		STS	Plieske and Struss 2001	
			Dion et al. 1995	
			Ferreira et al. 1995a	
			Pilet et al. 1998a,b, 2001	
			Ferreira et al. 1995b	
			Kole et al. 2002b	
	Virus mozaiky vodnice (TuMV)	AFLP, SSR	Hughes et al. 2003	
		RFLP	Walsh et al. 1999	
	Virus žluté mozaiky vodnice (TuYV)	AFLP	Dreyer et al. 2001	
	Hlízenka obecná <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		Zhao and Meng 2003	
Samčí sterilita	'Ogura' obnovitel fertility	RFLP, RAPD	Delourme et al. 1998	
		RAPD	Hansen et al. 1997	
		RAPD	Delourme et al. 1994	
		RFLP, RAPD	Jean et al. 1997, 1998	
		AFLP	Janeja et al. 2003	
		RFLP	Leino et al. 2003	
		AFLP	Ke et al. 2004, 2005	
		AFLP	Lu et al. 2004, Song et al. 2006	
Autoinkompatibilita				
Abiotický stress	Tolerance k chladu, odolnost k přezimování	RFLP, AFLP	Kole et al. 2002a	
Kvalita a obsah oleje	Obsah kys. erukové	RFLP	Ecke et al. 1995	
		RAPD	Rajcan et al. 1999	
		RFLP	Uzunova et al. 1995	
		SCAR, RAPD	Hu et al. 1999	
		AFLP	Schierholt et al. 2000	
		RAPD, ISSR, SCAR	Javidfar et al. 2006	
		SCAR, RAPD	Hu et al. 1999	
		Obsah kys. linolenové	RAPD	Hu et al. 1995
			RFLP, RAPD	Tanhuanpää et al. 1995
			RAPD	Jourdren et al. 1996
			RAPD	Somers et al. 1998
Glukosinuláty v semeni	RFLP	Uzunova et al. 1995		
		Howell et al. 2003		

2.3. Autoinkompatibilita u rodu *Brassica*

Autoinkompatibilita (AI) je mechanismus, který zabraňuje samoopylení. Řepka je jednou z důležitých pěstovaných plodin a současně se šlechtění řepky zaměřuje na tvorbu hybridů pro zvýšení výnosu. AI může být úspěšně použita pro účely hybridního šlechtění, pokud jsou dostupné dvě různé AI linie určené pro tvorbu hybridu. Výhodou je snadné množení AI linií, protože AI je snadno překonatelná např. postřikem slabého roztoku soli.

U rodu *Brassica* je AI sporofytického typu, což znamená, že AI reakce je kontrolována diploidním genotypem prašníku rodičovské rostliny. Prakticky to znamená, že pyl sporofytického typu nese dvě S-alely místo jedné (Franflin-Tong and Franklin, 2003).

Při zkoumání genetického založení AI se zjistilo, že je pod kontrolou S-locusu, který má velký počet alel (Ockendon, 1974; de Nettancourt, 1977). Jednotlivé alely tohoto lokusu, S-alely, byly podle svého účinku rozděleny na dvě třídy, a to na třídy I a II, přičemž třída I se považuje za dominantní nad třídou II (Nasrallah et al., 1991).

Na S-locusu se dlouho hledaly geny, které mají zásadní vliv na průběh AI reakce. Zejména při studiu *B. rapa* a *B. oleracea* byly objeveny dva, geny *SLG* a *SRK*, kterým se přikládá zásadní význam, ovšem stále chyběl gen pro pylový determinant. Ten byl objeven v roce 1999 u *B. rapa* a *B. oleracea*, jelikož splňoval všechny obecné požadavky, tj. lokalizace na S-locusu a vysoký stupeň polymorfismu. Od té doby je intenzivně studován a od studia genu *SLG* se již ustoupilo.

Na S-locusu byly identifikovány asi dvě desítky genů, které kosegregují přesně s AI fenotypem (Boyes et al. 1997, Casselman et al. 2000). Za důležité geny účastníci se AI reakce jsou považovány geny *SLG*, *SRK* a v poslední době se jeví jako významný gen *SCR*.

Významné geny S-locusu:

SRK (S-locus receptor kinase; Stein et al. 1991) gen kóduje transmembránový protein. Gen je exprimován v blizně a jeví se jako klíčový pro rozpoznávací reakci a AI odpověď. Zjednodušeně lze reakci popsat takto: po difúzi samčího determinantu do buněčných stěn papilárních buněk blizny se tento determinant naváže na *SRK*. Poté dojde k dimerizaci *SRK* (autofosforylaci), a tím je vyvolána AI odpověď.

SLG (S-locus glycoprotein; Nasrallah et al. 1985) - jeho role není příliš jasná. Skládá se ze sestřižitelného signálního peptidu, několika N-glykosilačních míst, třech hypervariabilních oblastí a 12 konzervativních cysteinů směrem k C konci peptidu (Takayama et al. 1987, Nasrallah et al. 1987). Protein *SLG* by mohl podporovat proces rozpoznání *SCR* nebo se účastní transportu *SCR* k cytoplazmatické membráně (Takasaki et al. 2000). *SLG* by

mohl napomáhat akumulaci SRK v papilárních buňkách (Dixit et al. 2000). Bylo potvrzeno, že SLG není k AI reakci nezbytně nutný (Takasaki et al. 2000). *SLG* geny byly rozděleny do dvou tříd – třídy I a třídy II.

SCR (*S*-locus cysteinerich protein; Schopfer et al. 1999), syn. *SP11* (Suzuki et al. 1999), je exprimován pouze v prašnicích. Patří ke skupině PCP proteinů a je považován za samčí determinant AI. Je produkován buňkami tapeta a váže se na protein genu *SLG* bez ohledu na *S*-haplotyp. Je v genové vazbě s geny *SLG* a *SRK* (Schopfer et al. 1999). U *B. rapa* bylo zjištěno, že *SCR* se exprimuje převážně v tapetu homozygotů třídy II. U heterozygotů třídy I a II je exprese třídy II potlačena (Shiba et al., 2002). Podobné alely *SCR* třídy I jako u rodu *Brassica* byly objeveny i u rodu *Raphanus* (Okamoto et al., 2004). Při mezidruhovém křížení *B. napus* a *B. oleracea* se na pozadí *B. napus*jevily *S*-alely *B. oleracea* jako dominantní (Ripley a Beversdorf, 2003).

Další důležité informace nám může poskytnout struktura proteinu *SCR*. V primární struktuře bylo pozorováno 8 konzervativních cysteinů (odtud název cysteine rich protein), jeden tyrosin a glycin, a to u alel obou tříd (Schopfer et al., 1999; Suzuki et al., 1999). Toto umožňuje alelám *SCR* udržet si podobnou strukturu proteinu (Mishima et al., 2003).

Specifita je v AI reakci určena alelově specifickou interakcí mezi *SRK* receptorem a *SCR* ligandem. Z toho vyplývá, že *SRK* a *SCR* se musejí vyvíjet zároveň, aby se udržela jejich interakce. V tomto dvougenovém systému vyžaduje vytvoření nových specifit výskyt nových mutací na receptoru a ligandu kódujícího stejný *S*-haplotyp, tak aby bylo udrženo navázání (Chookajorn et al., 2004). Statisticky bylo prokázáno, že *SP11* a *SRK* jednoho *S*-haplotypu u *B. oleracea* i *B. rapa* se odchyľují souběžně (Sato et al., 2002).

2.4. Distribuce různých *S*-haplotypů

Počet *S*-alel je odhadován u *Raphanus* na 34 (Sampson, 1957), 30 u *B. rapa* (Nou et al., 1993) a více než 50 u *B. oleracea* (Brace et al., 1994), *S*-alely v určitých odrůdách *B. oleracea* mohou být identifikovány pomocí testovacího křížení se sadou testovacích linií nesoucích různé *S*-alely (Thompson, 1968; Ockendon, 1975). Obecně se dá říci, že *S*-alely u *B. oleracea* vykazující nižší dominanci a jsou podrobeny více modifikacím než alely s vyšším stupněm dominance (Ockendon 1974, Smith 1977). AI rozpoznávací reakce představuje alelově specifickou interakci mezi vysoce polymorfním *S*-lokus receptorovou kinázou (*SRK*) blizny a jeho ligandem pocházejícím z pylu, proteinem *SCR*. Specifická funkce je nejspíše řízena různými variantami 4 sousedících aminokyselin z čehož vyplývá, že k dosažení nové

specificity je potřebná minimální pozměněná délka sekvence (Chookajorn, et al., 2004). Náhodné mutace genu *SCR* přetrvávají tak dlouho, dokud přetrvává vázací schopnost k příslušné aktivní alele genu *SRK*, což může vést ke zvýšené diverzifikaci sekvencí genu *SCR* uvnitř každé třídy funkčních alel. Toto je možný způsob jakým se vyvíjely AI specifické reakce (Chookajorn, et al., 2004).

U páru *S*-haplotypů *BrS*⁴⁶ z *B. rapa* a *BoS*⁷ z *B. oleracea* byly nalezeny podobné *SP11* alely s podobností předpokládané aminokyselinové sekvence 96,1 %. Uvažuje se o tom, že u *BrS*⁴⁶ a *BoS*⁷ přetrvává stejná rozpoznávací specifická od té doby, co se rozdělily tyto dva druhy. Aminokyselinová substituce u *SRK* a *SP11* alel *BrS*⁴⁶ a *BoS*⁷ *S*-haplotypů nemá žádný vliv na specifitu rozpoznávací reakce (Kimura et al., 2002).

Vysoce podobné *S*-haplotypy mezi *B. oleracea* a *B. rapa* byly také nalezeny Kusabou and Nishiem (1999), a pomocí opylovacích testů mezi mezidruhovými hybridy, transgenními rostlinami a pomocí rekombinovaných proteinů *SP11* byla demonstrována shodná specifická rozpoznávací reakce podobných *S*-haplotypů mezi těmito druhy (Kimura et al., 2002; Sato et al., 2003).

Velmi podobné sekvence se sekvencemi *SP11* u rodu *Brassica* byly nalezeny u *Raphanus sativus* a tudíž se předpokládá, že stejné nebo podobné *S*-haplotypy existují mezi různými druhy rodu *Brassica* a také mezi různými rody čeledi *Brassicaceae* (Okamoto et al., 2004). Oddělení *B. oleracea* a *B. rapa* nejspíše proběhlo dříve než došlo k rozdělení *Raphanus sativus* těchto dvou druhů rodu *Brassica* (Sakamoto et al., 1998).

2.5. Molekulární markery autoinkompatibility

Pomocí molekulárních markerů je možné rozlišit jednotlivé *S*-alely pro správné určení *S*-haplotypů u rodu *Brassica*. U *B. napus* je možné analyzovat pomocí molekulárních markerů segregující *F*₂ populaci po křížení AI a AK rodičů. Nejčastěji používaná je metoda PCR-RFLP. Tento typ markerů byl také popsán jako štěpené polymorfní sekvence (CAPS) (Konieczny and Ausubel, 1993). Nishio et al. (1996) klasifikoval 18 z 27 testovacích linií *B. rapa* po PCR-RFLP provedené s primery pro gen *SLG* třídy I. a restričním štěpením enzymem *Afa*I. *SLG* geny vykazovaly vysokou sekvenci homologii s geny příbuznými genům na *S*-lokusu (*SLR* I a *SLR* II), které nejsou spojeny s *S*-lokusem (Watanabe, et al., 1992). Tyto výsledky poukazují na to, že gen *SLG* je dobrý marker pro určování *S*-haplotypů (Park et al., 2002). PCR-CAPS analýza genu *SRK* byla také úspěšně použita pro identifikaci *S*-haplotypů (Park et al., 2002). V současné době je častěji používán k markerování gen *SCR*

pro svůj více polymorfní charakter než má gen *SRK*. Autoinkompatibilní rostliny ve štěpící F_2 populaci byly rozlišeny pomocí CAPS markerů se specifickými primery pro *S*-lokus (Möhring et al., 2005).

K určení AI specifické rozpoznávací reakce u zelenin rodu *Brassica* byly vyvinuty dvě metody dot-blot analýzy *SP11* alel. Jednou z nich je blotování DNA vzorků, tzn. rostlinné genomické DNA pomocí práb se značenými alelami *SP11* a další je blotování *SP11* DNA fragmentů prábami se značenými vzorky DNA, tzn. *SP11* kódující oblast je označena pomocí PCR, kde je templátem rostlinná genomická DNA. Ta první je užitečná při testování mnoho různých rostlinných materiálů a druhá, jestliže nemáme žádnou předchozí informaci o *S*-haplotypech v daném rostlinném materiálu (Fujimoto and Nishio, 2003).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

Pro tuto práci byly použity autoinkompatibilní linie Start, Tandem 6/85, AIK 3, Tandem 1/85, Catty, Liropa, Tandem, AIK 6 a odrůdy Global, Ramiro, Rasmus, Local.

Tyto rostlinné materiály byly analyzovány přímo a vyhodnoceny byly společně s údaji z databáze National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pro *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea* a také *Raphanus sativus*.

3.2. Metody

3.2.1. Izolace genomové DNA (Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitex)

1. v tekutém dusíku se zhomogenizuje 60 mg tekutého dusíku
2. k homogenizátu se přidá 400 μ l lyzačního pufru P a 20 μ l proteinázy K, zvortexovat, a 30 minut inkubovat při 65°C
3. přelijeme na kolonku a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm
4. k filtrátu přidáme 200 μ l vázacího pufru a důkladně zvortexovat
5. suspenzi přenést na kolonku a inkubovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
6. přidat 550 μ l promývacího pufru I a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
7. přidat 550 μ l promývacího pufru II a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát, tento krok opakovat 2x a nakonec centrifugovat 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění zbývajících ethanolu
8. kolonky s DNA navázanou na membráně dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 100 μ l elučního pufru D, který je předehřátý na 65°C, 3 min. inkubovat, centrifugovat 2 min. při 12000 rpm

3.2.2. Izolace plazmidové DNA (Invisorb Spin Plasmid Mini Kit - Invitex)

1. 2 μ l plazmidové DNA centrifugovat 1 min. na maximální rychlost, důkladně odstranit supernatant
2. pelet resuspendujeme ve 200 μ l resuspendačního roztoku
3. přidat 200 μ l alkalického lyzačního roztoku, 5 x převrátit eppendorfku a nechat lyzovat 5 min.
4. přidat 200 μ l neutralizačního roztoku, 4-6 x převrátit eppendorfku, centrifugovat 5 min. na maximální rychlost
5. čirý supernatant přelijeme na kolonku, a přidat 200 μ l vázacího roztoku, 1 x převrátit a centrifugovat 1 min. při 8000 rpm, slít filtrát
6. přidat 750 μ l promývacího pufu, centrifugovat 1 min. při 8000 rpm, slít filtrát
7. centrifugovat 3 min. na maximum kvůli odstranění ethanolu
8. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 50 μ l sterilní vody, inkubovat 1 min., centrifugovat 1 min. při 8000 rpm

3.2.3. PCR genu *SLG* třídy II

H₂O	18,4 μ l
Pufr	2,5 μ l
DNT's	2,0 μ l
Primery PS₂₁ + PS₃	0,2 μ l + 0,2 μ l
Taq polymeáza	0,2 μ l
DNA - templát	1,5 μ l

Cyklus: 35x

Denaturace	93°C 1 minuta
Annealing (nasedání primerů)	58°C 2 minuty
Elongace (syntéza řetězce)	72°C 3 minuty

Počáteční denaturace je 93°C 5 minut a konečná elongace 72°C 10 minut.

3.2.4. Příprava agarózového gelu

Složení 1,5% agarózového gelu:

objem	agaróza	5 x TBE	H₂O	ethidium bromid
50 ml	0,75 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,5 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	3,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

Složení 1,0 % agarózového gelu:

objem	agaróza	5 x TBE	H₂O	ethidium bromid
50 ml	0,50 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,0 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	2,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

- rozvařit v mikrovlnné troubě, nesmí být vidět vlákna
- připravit vanu a hřebeny
- zchladit (cca 60°C)
- přidat ethidium bromid
- nalít do vany, odstranit bubliny a nechat ztuhnout

Elektroforéza probíhá dle potřeby, obvykle 2 hod. při napětí 90 V.

Složení 5 x TBE (1l) pufu

Tris 54 g

k. boritá 27,5 g

0,5 M EDTA (pH = 8,0) 20 ml

3.2.5. Eluce fragmentů DNA z agarózového gelu (JETQUICK)

1. z agarózového gelu vyříznout bloček s požadovaným fragmentem
2. na každých 100 mg gelu přidat 300 μ l roztoku L1, inkubovat při 50°C 15 min., každé 3 min. protřepávat
3. roztok přenést na nové kolonky centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
4. přidat 500 μ l roztoku L2, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
5. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 50 μ l sterilní vody, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm

3.2.4. Klonování DNA (Topo TA cloning for sequencing kit – Invitrogen)

1. den

1. 2 μ l PCR produktu (nesmí být starší než jeden den) + 0,4 μ l Salt solution.
2. zamíchat, nechat stát 5 min. (větší PCR produkty 20 – 30 min.) při pokojové teplotě
3. přidat 17 μ l kompetentních buněk *E. coli* uříznutou špičkou, zamíchat
4. 30 min. nechat stát na ledu (je možné i skladovat přes noc při -20°C)
5. tepelný šok – 30 s ve vodní lázni při 42°C bez míchání a pak 2 min. na ledu
6. přidat 150 μ l temperovaného SOC média, promíchat, nenasávat
7. 1 hod. třepat při 37°C
8. mezitím rozetřít na misky s LB médiem 40 μ l Xgal (sterilní hokejkou) a dát na misky, temperovat na 37°C
9. vylít na misky buňky a pečlivě rozetřít
10. nechat kultivovat při 37 °C

2. den

1. vypíchnout 2 bílé kolonie (obsahují plazmid s produktem) + 3 ml LB média + 12 μ l AMP
2. kultivovat 16 hod. při 37 °C přes noc

3. den

1. odebrat 850 μ l kultury + 150 μ l glycerolu, zamrazit při -80 °C pro dlouhodobé uchování
2. izolace plazmidu kitem
3. vyštěpení plazmidu z vektoru *Eco RI*, elektroforéza

3.2.5. Restrikční štěpení

Pro rozlišení jednotlivých alel klonovaných sekvencí restrikční štěpení, a to podle instrukcí v příbalovém letáku jednotlivých enzymů. Většinou provádíme štěpení s 1 μ l plazmidu a 5 U enzymu. Reakce probíhá přes noc asi 1 hod..

3.2.6. Sekvenační reakce (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit – Beckman Coulter)

DH₂O (doplnit na objem 20 μl)	0-9,5 μ l
325 ng plazmidové DNA (do 5 kbp)	0,5-10,0 μ l
1,6 μM primer (M13 reverse, T7)	2,0 μ l
DTCS Quick Start Master mix	8,0 μ l

Denaturace plazmidu před přidáním do reakce: 86 °C 5 min., 20°C 1 min.

Cyklus: 96°C 20 s

50°C 20 s

60°C 4 min.

Celkem se opakuje 30 cyklů.

Přečištění sekvenační reakce:

1. připravit čerstvý roztok stop pufru před každým přečištěním, ložení na jednu reakci: 2 μ l 100 mM EDTA, 2 μ l 3M octanu sodného (pH 5,2), 1 μ l glykogenu
2. přidat 60 μ l chlazeného 96% ethanolu
3. centrifugovat 15 min. při 14000 rpm a při 4°C
4. pipetou odsát supernatant a přidat 200 μ l chlazeného 70% ethanolu, 5 min. při 14000 rpm a při 4°C
5. pipetou odsát supernatant a pelet nechat uschnout na vzduchu

3.2.7. Hodnocení sekvencí programem Bioedit

Neupravená data ze sekvenátoru ve formě souboru *.ab otevřeme v programu Bioedit. Kromě sekvence k úpravě se nám otevře ještě okno, ve kterém je chromatogram Primerové sekvence lze vyhledat v hlavním menu v liště Edit tlačítkem Search. Reverse sekvenci si lze otočit v menu Sequence → Nucleic Acid → Reverse Complement. Postupně sekvenci upravujeme pomocí režimu Select/Slide, Edit a Grab & Drag, tak, že ořízneme přečnívající plazmidové sekvence a případné chyby sekvenování opravíme podle lépe přečtené sekvence. Jako kontrola nám slouží originální chromatograf.

Upravené sekvence porovnáme programem Clustal, který je v menu Accessory Application → Clustal Multiple Alignment. Výsledný soubor sekvencí vyhodnotíme aplikací DNADist→Neighbor phylogenetic tree. Po analýze se nám jako poslední okno otevře 'Phylogenetic tree', což je soubor typu Phylip Trees (*.phy), který si uložíme a dále ho pak budeme používat jako 'outtree' v další aplikaci. Jelikož program Bioedit má velmi špatný grafický výstup, k lepší vizualizaci fylogramu použijeme program Tree View.

4. VÝSLEDKY

Získané sekvence genu *SLG* třídy II *Brassica napus* byly srovnány se sekvencemi jak *SLG* II, tak *SLG* I od různých druhů *Brassica* získaných z databáze National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Tyto sekvence byly společně hodnoceny pomocí programu Bioedit, jehož součástí je program Clustal, který slouží k porovnávání nukleotidových sekvencí. Dále byl programem Bioedit sestaven fylogenetický strom metodou Neighbor Joining. Výsledky jsou zde prezentovány pomocí dvou zobrazení fylogramu, a to kladogramu a radiálního stromu. U kladogramu můžeme dobře sledovat příbuznost jednotlivých sekvencí, kdežto u radiálního stromu je dobře vidět vzdálenost jednotlivých skupin. Z rozdělení je patrné, že se vytvořilo pět různých skupin.

Popis jednotlivých skupin sekvencí

Skupina 1 – Nejvíce odlišná skupina ze všech *SLG* sekvencí. Skládá se pouze z jedné sekvence, která pochází ze studie o diverzitě a distribuci S-haplotypů u komerčních odrůd zelenin rodu *Brassica* v Číně (Wang et al. 2006, nepublikováno) dostupné na stránkách NBCI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Třída S-haplotypů není známá.

Skupina 2 – Tato skupina obsahuje 5 výrazně podobných druhů *Brassica* a obsahuje jak AI, tak AK linie. Všechny tyto sekvence pocházejí ze studie, která se zabývá srovnáním genů na S-lokusu u AI a AK druhů *Brassica* (He et al. 2003, nepublikováno). Třída S-haplotypů není známá.

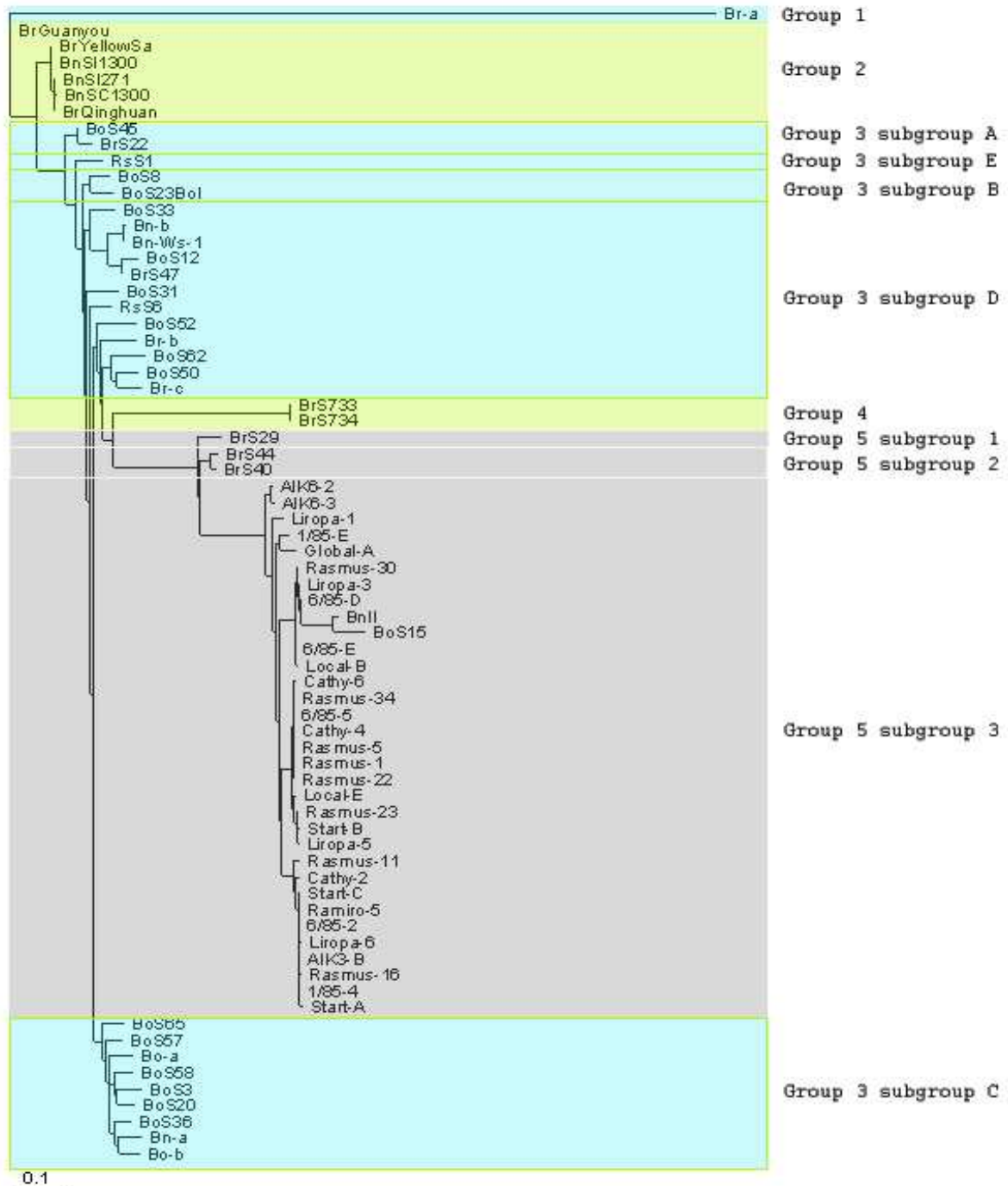
Skupina 3 – Tato skupina je největší. Zahrnuje různé druhy *Brassica* včetně *Raphanus sativus*. Je rozdělená do pěti podskupin A-E. Většina *SLG* sekvencí byly S-haplotypy třídy II, údaje o třídě u zbytku sekvencí nejsou známy. Podskupina A se skládá ze sekvencí *SLG B. oleracea* a *B. rapa* různých S-haplotypů, podskupina B ze dvou různých S-haplotypů *B. oleracea*, podskupina C z různých S-haplotypů *B. oleracea* a jednoho *B. napus*, podskupina D z různých S-haplotypů *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus* a *Raphanus sativus*. Podskupina E je *Raphanus sativus*.

Skupina 4 – Dvě velmi odlišné *SLG* sekvence *B. rapa* s neuvedenou třídou *S*-haplotypu (Gothandam et al. 2005).

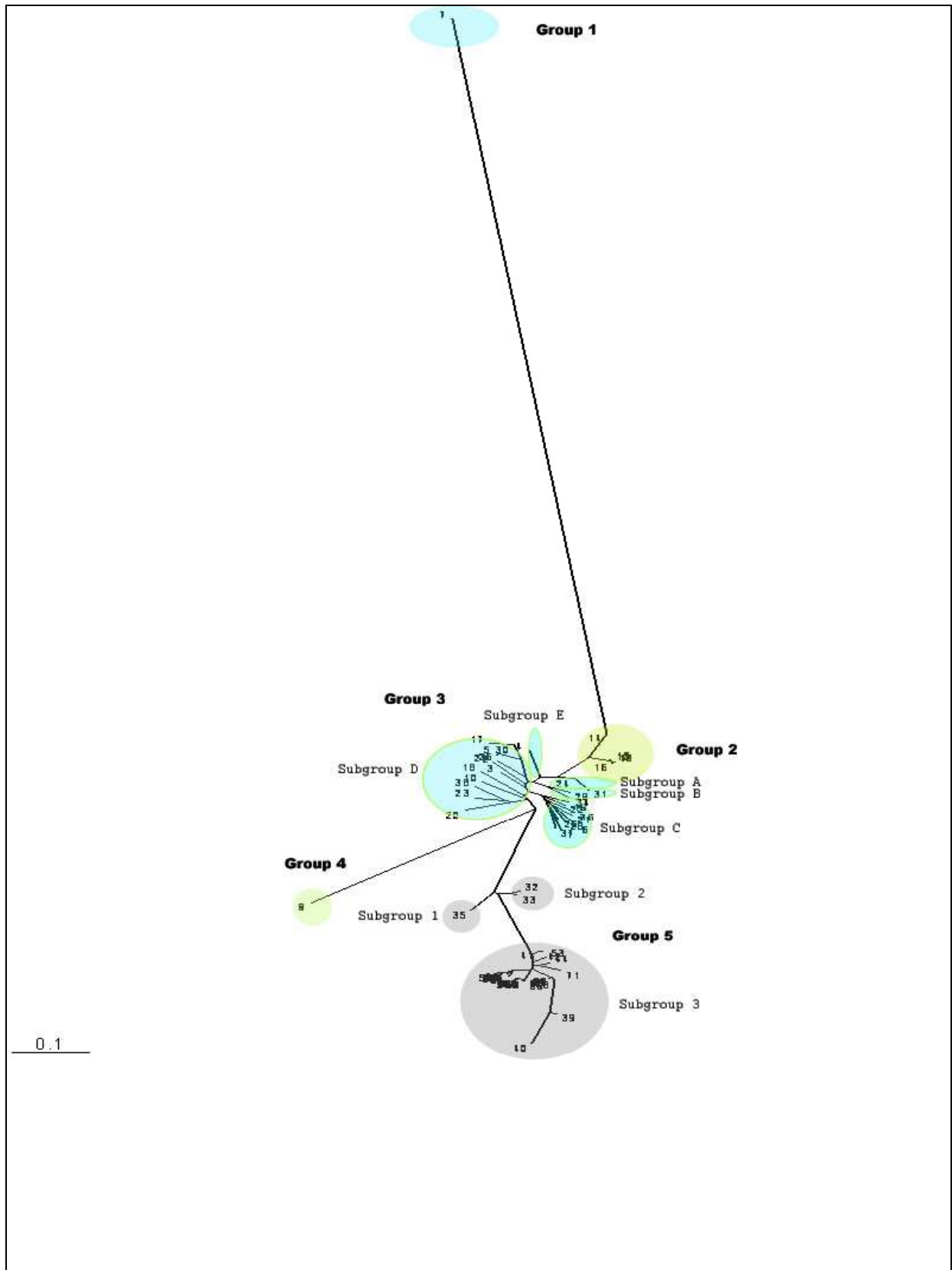
Skupina 5 – Tato skupina se skládá pouze s *S*-haplotypů třídy II. Podskupiny I. a II. jsou různé *S*-haplotypy *B. rapa*. Podskupina III. Je ucelená skupina, která se skládá z analyzovaných AI linií a odrůd, a také *S*-haplotypu 15 (Cabrillac et al. 1999) a *B. napus* s blíže nespécifickým *S*-haplotypem (Robert et al. 1994).

Obr. 2. Fylogram alel genu *SLG* třídy I. a II. u různých druhů. A) Fylogram je rozdělen na 5 skupin, které představují genetickou vzdálenost mezi různými alelami, druhy a třídami *SLG*. B) Tento neukořeněný kladogram ukazuje lépe rozdíly mezi *SLG* sekvencemi a zvláště pak mezi skupinou I. a ostatními skupinami. Popis zkratk je uvedený za obrázky.

A)



B)



1:Z11725: B.napus mRNA for S-locus glycoprotein. (Goring et al. 1992) --> Bn-a
2:L08608: Brassica napus S-locus glycoprotein mRNA, complete cds. (Goring et al.1993, cultivar Westar) --> Bn-b
3:AB009682: Raphanus sativus SLG(S6) gene for S glycoprotein, partial cds.(Sakamoto et al. 1998) --> RsS6
4:AB009677: Raphanus sativus SLG(S1) gene for S glycoprotein, partial cds. (Sakamoto et al. 1998) --> RsS1
5:Z21608: B.napus mRNA for endogenous S-locus glycoprotein (clone SLG-Ws-1).(Robert et al. 1994) --> Bn-Ws-1
6:X79431: B.oleracea SLG3 mRNA. (Delorme et al. 1995) --> BoS3
7:DQ372708: Brassica rapa S-locus glycoprotein gene, complete cds. (Wang et al.2006) --> Br-a
8:DQ317532: Brassica rapa haplotype 733 S locus glycoprotein (SLG) mRNA,(Gothandam et al.2005) --> BrS733
9:DQ317531: Brassica rapa haplotype 734 S locus glycoprotein (SLG) mRNA, (Gothandam et al.2005) --> BrS734
10:D30050: Brassica rapa mRNA for S-locus glycoprotein of Brassica campestris (Watanabe et al.1994) --> Br-b
11:AY448036: Brassica napus cultivar SC1300 S-locus glycoprotein (SLG) gene, (HE et al.2003) --> BnSC1300
12:AY448034: Brassica napus cultivar SI271 S-locus glycoprotein (SLG) gene, (HE et al.2003) --> BnSI271
13:AY448032: Brassica napus cultivar SI1300 S-locus glycoprotein (SLG) gene, (HE et al.2003) --> BnSI1300
14:AY448030: Brassica rapa cultivar Guanyou S-locus glycoprotein (SLG) gene, (HE et al.2003) --> BrGuanyou
15:AY448028: Brassica rapa cultivar Yellow sarson S-locus glycoprotein (SLG) (HE et al.2003) --> BrYellowSarson
16:AY448026: Brassica rapa cultivar Qinghuang S-locus glycoprotein (SLG) gene, (HE et al.2003) --> BrQinghuang
17:AB180902: Brassica oleracea S-12 SLG gene for S-locus glycoprotein, complete (Fujimoto et al. 2006) --> BoS12
18:AB054815: Brassica rapa SLG-52 mRNA for S-locus glycoprotein, partial cds.(Takasaki et al.1999) --> BoS52
19:AB054737: Brassica oleracea SLG-65 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS65
20:AB054736: Brassica oleracea SLG-62 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS62
21:AB054735: Brassica oleracea SLG-58 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS58
22:AB054734: Brassica oleracea SLG-57 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS57
23:AB054733: Brassica oleracea SLG-50 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS50
24:AB054732: Brassica oleracea SLG-45 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS45
25:AB054731: Brassica oleracea SLG-36 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS36
26:AB054730: Brassica oleracea SLG-33 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS33
27:AB054729: Brassica oleracea SLG-31 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS31
28:AB054728: Brassica oleracea SLG-20 mRNA for S-locus glycoprotein, partial (Sato et al. 2002) --> BoS20
29:AB054727: Brassica oleracea SLG-8 mRNA for S-locus glycoprotein, partial cds. (Sato et al. 2002) --> BoS8
30:AB054705: Brassica rapa SLG-47 mRNA for S-locus glycoprotein, partial cds. (Sato et al. 2002) --> BrS47
31:AB054060: Brassica rapa SLG22 mRNA for S locus glycoprotein, complete cds. (Hatakeyama et al. 2001) --> BrS22
32:AB054059: Brassica rapa SLG44 mRNA for S locus glycoprotein, partial cds. (Hatakeyama et al. 1998) --> BrS44
33:AB054058: Brassica rapa SLG40 mRNA for S locus glycoprotein, partial cds. (Hatakeyama et al. 1998) --> BrS40

34:AB013719: Brassica oleracea mRNA for SLG23Bol, complete cds. (Kusaba and Nishio 1999) --> BoS23Bol
35:AB008190: Brassica rapa gene for SLG29, complete cds. (Hatakeyama et al. 1998) -> BrS29
36:D85228: Brassica oleracea DNA for S glycoprotein, partial cds.(Kusaba et al.1997)
--> Bo-a
37:D85229: Brassica oleracea DNA for S glycoprotein, partial cds. (Kusaba et al.1997) --> Bo-b
38:D85227: Brassica campestris DNA for S glycoprotein, partial cds. (Kusaba et al.1997) --> Br-c
39:Z19548: B.napus mRNA for S-locus glycoprotein type II (Robert et al. 1994) --> BnII
40:Y18261: Brassica oleracea SLGB gene, partial (Cabrillac et al. 1999) --> BoS15
41:AIK6-2
42:AIK6-3
43:AIK3-B
44:1/85-E
45:1/85-2
46:6/85-2
47:6/85-5
48:8/85-D
49:6/85-E
50:Start-A
51:Start-B
52:Start-C
53:Liropa-1
54:Liropa-3
55:Liropa-5
56:Liropa-6
57:Cathy-2
58:Cathy-4
59:Cathy-6
60:Local-B
61:Local-E
62:Rasmus-1
63:Rasmus-5
64:Rasmus-11
65:Rasmus-16
66:Rasmus-22
67:Rasmus-23
68:Rasmus-30
69:Rasmus-34
70:Ramiro-5
71:Global-A

5. DISKUSE

Aminokyselinová sekvence genu *SLG* je vysoce polymorfní kromě 12 cysteinů, které jsou přítomné vždy v podobné pozici (Kusaba et al., 1997). Dva velmi podobné *S*-haplotypy byly nalezeny u *B. oleracea* a *B. rapa* (Kusaba and Nishio, 1999). Rozpoznávací specifita pylu byla prokázána u těchto dvou druhů mezidruhovou hybridizací nebo pomocí transgenoz (Kimura et al., 2002; Sato et al., 2003). Kimura et al. (2002) předpokládá, že stejná rozpoznávací specifita se udržela také po rozdělení těchto dvou druhů. U *Brassica napus* jsou nejspíše *S*-alely v populaci konzervovány. Přestože je gen *SLG* vysoce polymorfní, přítomnost jednotlivých různých alel u *B. napus* v populaci je nízká. Obecně se dá říci, že neexistuje výrazný rozdíl mezi sekvencemi genu *SLG* třídy II. AI linií a AK odrůdami řepky.

Podle fylogenetického stromu srovnávajícího sekvence *SLG* genu třídy II. u *B. napus* se sekvencemi *SLG* genu třídy I. a II. u různých *B. napus* nebo jejich příbuzných druhů, jako je *B. oleracea*, *B. rapa*, *Raphanus sativus*, se zdají být větší rozdíly mezi třídami *S*-haplotypů než mezi druhy samotnými. Některé *S*-haplotypy z *B.rapa* a *B.oleracea* si zachovaly stejnou rozpoznávací specifitu ještě po rozdělení druhů, což je důkaz transdruhové evoluce AI genů (Kimura et al., 2002). Alely *SLG* a *SRK* třídy II mají z fylogenetického hlediska odlišný původ než alely třídy I (Hinata et al., 1995; Kusaba et al., 1997). Obdobné pozorování bylo provedeno i u *SCR* (Shiba et al., 2002). Skupina 5 a skupina 2 nevykazují žádný rozdíl mezi sekvencemi genu *SLG* u AI a AK rostlin *B. napus*. Z tohoto by se dalo usoudit, že *SLG* gen třídy II. není důležitý při autoinkompatibilní reakci. Bylo potvrzeno, že *SLG* není k AI reakci nezbytně nutný (Takasaki et al. 2000).

6. ZÁVĚR

Sekvenčí *SLG* genu třídy II z *B. napus* byly srovnány se všemi dostupnými sekvencemi genu *SLG* z databáze NCBI a nebyla nalezena žádná odlišnost mezi autoinkompatibilními liniemi a autokompatibilními odrůdami řepky. Po srovnání a získaných *SLG* sekvencí se zdá, že *S*-alely nejsou tak rozlišné u různých druhů jako mezi dvěma třídami genu *SLG*.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Bannerot, H., Boulidard, L., Cauderon, Y., Tempe, J. (1874): Cytoplasmic male sterility transfer from *Raphanus* to *Brassica*. *Proc Eucarpia Meet Crop Set Cruciferae* 25: 52-54.

Baranger A., Delourme R., Foisset. N., Barret, P., Dupuy, P., Renard, M., Chèvre, A. (1997): Wide mapping of a T-DNA insertion site in oilseed rape using bulked segregant analysis and comparative mapping. *Plant Breed* 116: 553-560.

Barret, P., Guérif, J., Reynoird, J., Delourme R., Eber, F., Renard, M., Chèvre, A. (1998a): Selection of stable *Brassica napus* – *Brassica juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) 2. A ‘to and fro’ strategy to localise and characterise interspecific introgression on the *B. napus* genome. *Theor Appl Genet* 96: 1097-1103.

Barret, P., Delourme R., Foisset. N., Renard, M. (1998b): Development of a SCAR (sequence characterised amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (*Bzh*) gene in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet* 97: 828-833.

Becker, H.C., Engqvist, G.M., Karlsson, B. (1995): Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 91: 62-67.

Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., Vrebalov, J., Nasrallah, J.B. (1997): The self-incompatibility (S) haplotypes of Brassica contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell* 9: 237-247.

Brace, J., King, G.J., Ockendon, D.J. (1994): A molecular approach to the identification of S alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant Reprod.* 7: 203-208.

Brunel, D., Froger, N., Pelletier, G. (1999): Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome* 42: 387-402.

Burns, M.J., Barnes, S.R., Bowman, J.G., Clarke, M.H.E., Werner, C.P., Kearsey, M.J. (2003): QTL analysis of an intervarietal set substitution lines in *Brassica napus*: (i) seed oil content and fatty acid composition. *Heredity* 90: 39-48.

Cabrillac, D., Delorme, V., Garin, J., Ruffio-Chable, V., Giranton, J.L., Dumas, C., Gaude, T. and Cock, J.M. (1999): The S15 self-incompatibility haplotype in *Brassica oleracea* includes three S gene family members expressed in stigmas. *Plant Cell* 11: 971-986.

Charters, Y.M., Robertson, A., Wilkinson, M.J. (1996): PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor Appl Genet* 92: 442-447.

Chen, J.L., Beversdorf, W.D. (1990): Fatty acid inheritance in microspore-derived populations of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 80: 465-469.

Cheung, W.Y., Champagne, G., Hubert, N., Landry, B.S. (1997): Comparison of the genetic maps of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 94: 569-582.

- Chèvre, A.M., Barret, P., Eber, F., Dupuy, P., Brun, H., Tanguy, X., Renard, M.** (1997): Selection of stable *Brassica napus*-*B. Juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. *Theor Appl Genet* 95: 1104-1111.
- Chookajorn, T., Kachroo, A., Ripoll, D.R., Clark, A.G., Nasrallah, J.B.** (2004): Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. *PNAS*. 4: 911-917.
- Delourme, R., Bouchereau, A., Hubert, N., Renard, M., Landry, B.S.** (1994): Identification of RAPD markers linked to fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 88: 741-748.
- Delourme, R., Foisset, N., Horvais, R., Barret, P., Champagne, G., Cheung, W.Y., Landry, B.S., Renard, M.** (1998): Characterisation of the radish introgression carrying the *Rfo* restorer gene for the *Ogu*-INRA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 97: 129-134.
- Delourme, R., Pilet-Nayel, M.L., Archipiano, M., Horvais, R., Tanguy, X., Rouxel, T., Brun, H., Renard, M., Balesdent, M.H.** (2004): A Cluster of Major Specific Resistance Genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* 94: 578-583.
- de Nettancourt, D.** (1977): Incompatibility in angiosperms. Berlin: Springer.
- Diers, B.W., Osborn, T.C.** (1994): Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 88: 662-668.
- Diers, B.W., McVetty, P.B.E., Osborn, T.C.** (1996): Relationship between heterosis and genetic distance based on restriction fragment length polymorphism markers in oilseed rape (*Brassica napus*). *Crop Sci.* 36: 79-83.
- Dixit, R., Mikhail, Nasrallah, M.E., Nasrallah, J. B.** (2000): Post-Transcriptional Maturation of the S Receptor Kinase of Brassica Correlates with Co-Expression of the S-Locus Glycoprotein in the Stigmas of Two Brassica Strains and in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Physiol.* 124: 297-312.
- Dreyer, F., Graichen, K., Jung, C.** (2001): A major quantitative trait locus for resistance to Turnip Yellow Virus (TuYV, syn. Beet western yellows virus, BWYV) in rapeseed. *Plant Breeding* 120: 457-462.
- Ecke, W., Uzunova, M., Weißleder, K.** (1995): Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). II. Localization of genes controlling erucic acid synthesis and seed oil content. *Theor Appl Genet* 91: 972-977.
- Ferreira, M.E., Williams, P.H., Osborn, T.C.** (1994): RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled haploid lines. *Theor Appl Genet* 89: 615-621.

- Foisset, N., Delourme, R., Barret, P., Hubert, N., Landry, B.S., Renard, M.** (1995): Molecular mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on doubled-haploid progeny. *Theor Appl Genet* 93: 1017-1025.
- Foisset, N., Delourme, R., Lucas, M-O., Renard, M.** (1997): In vitro androgenesis and segregation distortion in *Brassica napus* L.: spontaneous versus colchicine-doubled lines. *Plant Cell Reports* 16: 464-468.
- Fourmann, M., Barret, P., Renard, M., Pelletier, G., Delourme, R., Brunel, D.** (1998): The two genes homologous to *Arabidopsis FAE1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 96: 852-858.
- Fourmann, M., Barret, P., Froger, N., Baron, C., Charlot, F., Delourme, R., Brunel, D.** (2002): From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theor Appl Genet* 105: 1196-1206.
- Franklin-Tong, V.E., Atwal, K.K., Howell, E.C., Lawrence, M.J., Franklin, F.C.H.** (1991): Self-incompatibility in *Papaver rhoeas*: There is no evidence for involvement of stigmatic ribonuclease activity. *Plant Cell Environ.* 14: 423-429.
- Franklin-Tong, V.E., Franklin, F.C.H.** (2003): Different mechanismus of gametophytic self-incompatibility. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1025-1032.
- Fray, M.J., Puangsomlee, P., Goodrich, J., Coupland, G., Evans, E.J., Arthur, A.E., Lydiate, D.J.** (1997): The genetics of stamenoid petal production in oilseed rape (*Brassica napus*) and equivalent variation in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 94: 731-736.
- Frello, S., Hansen, K.R., Jensen, J., Jørgensen, R.B.** (1995): Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD markers and a transgene in the cross *B. juncea* × (*B. juncea* × *B. napus*). *Theor Appl Genet* 91: 236-241.
- Fu, T.D.** (1981): Production and research of rapeseed in the People's Republic of China. *Eucarpia Cruciferae Newsl* 6: 6-7.
- Fu, T.D., Yang, G.S.** (1998): Rapeseed mustard. In: Banga, S.S., Banga, S.K. (eds) Hybrid cultivar development. Co-Publication Springer, Berlin Heidelberg New York and Narosa Publishing House, New Delhi, pp 402-431.
- Fujimoto, R., Nishio, T.** (2003): Identification of *S*-haplotypes in *Brassica* by dot blot analysis of *SP11* alleles. *Theor Appl Genet* 106: 1433-1437.
- Gothandam, K. M., Hyun, J., Chung, Y.-Y.**: Dominance relationship between the two self-incompatible *Brassica campestris* plants in response to CO₂ gas. Unpublished (submitted to genbank 2005, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Halldén, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M., Säll, T.** (1994): Evaluation of RFLP and RAPD markers in comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor Appl Genet* 88: 123-128.

- Hansen, L.B., Siegismund, H.R., Jørgensen, R.B.** (2001): Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 621-627.
- Hansen, L.B., Siegismund, H.R., Jørgensen, R.B.** (2003): Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and *B. rapa*. *Heredity* 91: 276-283.
- Hansen, M., Halldén, C., Nilsson, N.O., Säll, T.** (1997): Marker-assisted selection of restored male-fertile *Brassica napus* plants using a set of dominant RAPD markers. *Molecular Breeding* 3: 449-456.
- Hanson, M.R.** (1991): Plant mitochondrial mutations and cytoplasmic male sterility. *Annu Rev Genet* 25: 461-486.
- Hasan, M., Seyis, F., Badani, A.G., Pons-Kühnemann, J., Friedt, W., Lühs, W., Snowdon, R.J.** (2005): Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 793-802.
- Hawkins, G.P., Zhang, X., Thiagarjan, M.R., Corrigan, L.M., Stringam, G.R.** (2005): Identification of RAPD markers linked to pod length in *Brassica napus* L. canola. *Can. J. Plant Sci.* 85: 803-808.
- Hinata, K., Watanabe, M., Yamakawa, S., Satta, Y., Isogai, A.** (1995): Evolutionary aspects of the S-related genes of the Brassica selfincompatibility system: synonymous and non-synonymous base substitutions. *Genetics* 140:1099-1104.
- Howell, P.M., Sharpe, A.G., Lydiate, D.J.** (2003): Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* 46: 454-460.
- Hu, J., Quiros, C., Arus, P., Struss, D., Robbelen, G.** (1995): Mapping of a gene determining linolenic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. *Theor Appl Genet* 90: 258-262.
- Hu, J., Li, G., Struss, D., Quiros, C.F.** (1999): SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon acids in rapeseed *Brassica napus*. *Plant Breeding* 118: 145-150.
- Hu, X., Sullivan-Gilbert, M., Gupta, M., Thompson, S.A.** (2006): Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of *fad2* and *fad3* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 113: 497-507.
- Hughes, S.L., Hunter, P.J., Sharpe A.G., Kearsey M.J., Lydiate D.J., Walsh, J.A.** (2003): Genetic mapping of the novel *Turnip mosaic virus* resistance gene *TuRB03* in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 107: 1169-1173.
- Janeja, H.S., Banga, S.S., Lakshmikumaran, M.** (2003): Identification of AFLP markers linked to fertility restorer genes for *tournefortii* cytoplasmic male-sterility system in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 107: 148-154.

- Javidfar, F., Ripley, V.L., Roslinsky, V., Zeinali, H., Abdmishani, C.** (2006): Identification of molecular markers associated with oleic and linolenic acid in spring oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Breeding* 125: 65-71.
- Jean, M., Brown, G.G., Landry, B.S.** (1997): Genetic mapping of nuclear fertility restorer genes for the 'Polima' cytoplasmic male sterility in canola (*Brassica napus* L.) using DNA markers. *Theor Appl Genet* 95: 321-328.
- Jean, M., Brown, G.G., Landry, B.S.** (1998): Targeted mapping approaches to identify DNA markers linked to the Rfpl restorer gene for the 'Polima' CMS of canola (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 97: 431-438.
- Jourdren, C., Barret, P., Horvais, R., Delourme, R., Renard, M.** (1996): Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica* 90: 351-357.
- Ke, L., Sun, Y., Liu, P., Yang, G.** (2004): Identification of AFLP fragments linked to one recessive genic male sterility (RGMS) in rapeseed (*Brassica napus* L.) and conversion to SCAR markers for marker-aided selection. *Euphytica* 138: 163-168.
- Ke, L.P., Sun, Y.Q., Hong, D.F., Liu, P.W., Yang, G.S.** (2005): Identification of AFLP markers linked to one recessive genic male sterility gene in oilseed rape, *Brassica napus*. *Plant Breeding* 124: 367-370.
- Kimura, R., Sato, K., Fujimoto, R., Nishio, T.** (2002): Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant J.* 29: 215-223.
- Kole, C., Thormann, Karlsson, B.H., Palta, J.P., Gaffney, P., Yandell, B., Osborn, T.C.** (2002): Comparative mapping of loci controlling winter survival and related traits in oilseed *Brassica rapa* and *B. napus*. *Molecular Breeding* 9: 201-210.
- Kole, C., Williams, P.H., Rimmer, S.R., Osborn, T.C.** (2002b): Linkage mapping of genes controlling resistance to white rust (*Albugo candida*) in *Brassica rapa* (syn. *campestris*) and comparative mapping to *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome* 45: 22-27.
- Konieczny, A., Ausubel, F.** (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype specific PCR based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Kusaba, M., Nishio, T., Satt, Y., Hinata, K., Ockendon, D.** (1997): Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implication for evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7673-7678.
- Kusaba, M., Nishio, T.** (1999): Comparative analysis of *S* haplotypes with very similar *SLG* alleles in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Plant J.* 17: 83-91.
- Landry, B.S., Hubert, N., Etoh, T., Harada, J.J., Lincoln, S.E.** (1991): A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* 34: 543-552.

- Leino, M., Teixeira, R., Landgren, M., Glimelius, K.** (2003): *Brassica napus* lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theor Appl Genet* 106: 1156-1163.
- Li, S.L., Qian, Y.X., Wu, Z.H., Stefansson, B.R.** (1988): Genetic male sterility in rape (*Brassica napus* L.) conditioned by interaction of genes at two loci. *Can J Plant Sci* 68: 1115-1118.
- Lombard, V., Baril, C.P., Dubreuil, P., Blouet, F., Zhang, D.** (2000): Genetic relationship and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Sci* 40: 1417-1425.
- Lombard, V., Delourme, R.** (2001): A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theor Appl Genet* 103: 491-507.
- Lu, G.Y., Yang, G.S., Fu, T.D.** (2004): Molecular mapping of dominant genic male sterility gene *Ms* in rapeseed (*Brassica napus*). *Plant Breeding* 123: 262-265.
- Lydiate, D., Sharpe, A., Lagercrantz, U., Parkin, I.** (1993): Mapping the *Brassica* genome. *Outlook Agrik* 22: 85-92.
- Mailer, R.J., Scarth, R., Fristensky, B.** (1994): Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor Appl Genet* 87: 697-704.
- Marshall, P., Marchand, M.C., Lisieczko, Z., Landry, B.S.** (1994): A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F1 hybrids. *Theor Appl Genet* 89: 853-858.
- Meng, J.L., Shi, S.W., Gan, L., Li, Z.Y., Qu, X.S.** (1998): The production of yellow-seeded *Brassica napus* (AACC) through crossing interspecific hybrids of *B. campestris* (AA) and *Brassica carinata* (BBCC) with *B. napus*. *Euphytica* 103: 329-333.
- Mikkelsen, T.R., Jensen, J., Jørgensen, R.B.** (1996): Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica campestris*. *Theor Appl Genet* 92: 492-497.
- Mishima, M., Takayama, S., Sasaki, K.-I., Jee, J.-G., Kojima, C., Isogai, A., Shirakawa, M.** (2003): Structure of the Male Determinant Factor for *Brassica* Self-incompatibility. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 36389-36395.
- Möhring, S., Horstmann, V., Esch, E.** (2005): Development of a molecular CAPS markers for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different *S* alleles. *Plant Breeding* 124: 105-110.
- Nasrallah, J.B., Kao, T.-H., Chen, C.-H., Goldberg, M.L., Nasrallah, M.E.** (1987): Amino acid sequences of glycoproteins encoded by three alleles of the *S* locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 326, 617-619.

- Nasrallah, J.B., Nishio, T., Nasrallah, M.E.** (1991): The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 393-422.
- Nishio, T., Kusaba M., Watanabe, M., Hinata, K.** (1996): Registration of S alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor. Appl. Genet.*, **92**: 1329-1334.
- Nou, I., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K.** (1993): Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant. Reprod.* 6: 79-86.
- Ockendon, D.J.** (1974): Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open pollinated cultivars of Brussels Sprouts. *Heredity* 33: 159-171.
- Ockendon, D.J.** (1975): The S allele collection of *Brassica oleracea*. *Incomp. Newsl.* 5: 82-84.
- Ogura, H.** (1968): Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem Fac Agric Kagashima Univ* 2: 39-78.
- Okamoto, S., Sato, Y., Sakamoto, T., Nishio, T.** (2004): Distribution of similar self-incompatibility (S) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. *Sex Plant Reprod* 17: 33-39.
- Osborn, T.C., Butruille, D.V., Sharpe, A.G., Pickering, K.J., Parkin, I.A.P. et al.** (2003): Detection and effects of a homeologous reciprocal transposition in *Brassica napus*. *Genetics* 165:1569-1577.
- Pallett, D.W., Huang, L., Cooper J.I., Wang, H.** (2006): Within-population variation in hybridisation and transgene transfer between wilde *Brassica rapa* and *Brassica napus* in UK. *Ann Appl Biol* 148: 147-155.
- Park, J.I., Lee, S.S., Watanabe, M., Takahata, Y., Nou, I.S.** (2002): Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 121: 192-197.
- Parkin, I.A.P., Sharpe, A.G., Keith, D.J., Lydiate, D.J.** (1995): Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* 38: 1122-1131.
- Parkin, I.A.P., Lydiate, D.J.** (1997): Conserved patterns of chromosome pairing and recombination in *Brassica napus* crosses. *Genome* 40: 496-504.
- Piquemal, J., Cinquin, E., Couton, F., Rondeau, C., Signoret, E., Doucet, I., Perret, D., Villeger, M.-J., Vincourt, P., Blanchard, P.** (2005): Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor Appl Genet* 111: 1514-1523.

- Pilet, M.L., Duplan, G., Archipiano, Barret, P., Baron, C., Horvais, R., Tanguy, X., Lucas, O.M., Renard, M., Delourme, R.** (2001): Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oil rape. *Crop Sci.* 41: 197-205.
- Plieske, J., Struss, D., Röbbelen, G.** (1998): Inheritance of resistance derived from the B-genome of *Brassica* against *Phoma lingam* in rapeseed and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet* 97: 929-936.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A.** (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.
- Rajcan, I., Kasha, K.J., Kott, L.S., Beversdorf, W.D.** (1999): Detection of molecular markers associated with linolenic and erucic acid levels in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 105: 173-181.
- Rajcan, I., Kasha, K.J., Kott, L.S., Beversdorf, W.D.** (2002): Evaluation of cytoplasmic effects on agronomic and seed quality traits in two doubled haploid populations of *Brassica napus* L. *Euphytica* 123: 401-409.
- Ripley, V., L., Beversdorf, W., D.** (2003): Development of self-incompatible *Brassica napus*: (III) *B. napus* genotype effects on S-allele expression. *Plant Breeding* 122: 12-18.
- Robert, L. S., Allard, S., Franklin, T. M., Trick, M.** (1994): Sequence and expression of endogenous S-locus glycoprotein genes in self-compatible *Brassica napus*. *Mol. Gen. Genet.* 242: 209-216.
- Sakamoto, K., Kusaba, M., Nishio, T.** (1998): Polymorphism of the S-locus glycoprotein gene (*SLG*) and S-locus related gene (*SLRI*) in *Raphanus sativus* L. and self-incompatible ornamental plants in the Brassicaceae. *Mol Gen Genet* 258: 397-403.
- Sampson, D.R.** (1957): The genetics of self-incompatibility in the radish. *J. Heredity* 48: 26-29.
- Sato, K., Nishio, T., Kimura, R., Kusaba, M., Suzuki, T., Hatakeyama, K., Ockendon, D. J. and Satta, Y.** (2002): Coevolution of the S-locus genes SRK, SLG and SP11/SCR in *Brassica oleracea* and *B. rapa*. *Genetics* 162: 931-940.
- Sato, K., Fujimoto, R., Toriyama, K., Nishio, T.** (2003): Commonality of self-recognition specificity of S haplotypes between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* 52: 617-626.
- Sharpe, A.G., Parkin, I.A.P., Keith, D.J., Lydiate, D.J.** (1995): Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* 38: 1112-1121.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, K., Shimohato, H., Che, F.-S., Satta, Y., Ito, A., Takada, Y., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S.** (2002): The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in *Brassica* Pollen Is Regulated at the RNA Level. *The Plant Cell* 14: 491-504.

- Shierholt, A., Becker, H.C., Ecke, W.** (2000): Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 101: 897-901.
- Shirzadegan, M., Röbbelen, G.** (1985): Influence of seed colour and hull proportions on quality properties of seeds in *Brassica napus* L. *Fette Seifen Anstrichm* 87: 235-237.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B.** (1999): The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697-1700.
- Seyis, F., Snowdown, R.J., Lühs, W., Friedt, W.** (2003): Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breed* 122: 473-478.
- Song, L.Q., Fu, T.D., Tu, J.X., Ma, C.Z., Zang, G.S.** (2006): Molecular validation of allele inheritance for dominant genic male sterility gene in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet* 113: 55-62.
- Somers, D.J., Friesen, K.R.D., Rakow, G.** (1998): Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 96: 897-903.
- Somers, D.J., Rakow, G., Prabhu, V.K., Friesen, K.R.D.** (2001): Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome* 44: 1077-1082.
- Song, L.-Q., Fu, T.-D., Tu, J.-X., Ma, C.-Z., Yang, G.-S.** (2006): Molecular validation of multiple allele inheritance for dominant genic male sterility gene in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet* 113: 55-62.
- Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B.** (1991): Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88: 8816-8820.
- Stringam, G.R., McGregor, D.I., Pawlowski, S.H.** (1974): Chemical and morphological characteristics associated with seed coat colour in rapeseed. In: *Proc 4th Int Rapeseed Conf. Giessen*, pp 99-108.
- Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., Hinata, K.** (1999): Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391-400.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K.** (2000): The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* 403: 913-916.
- Takayama, S., Isogai, A., Tsukamoto, C., Ueda, Y., Hinata, K., Okazaki, K., Suzuki, A.** (1987): Sequences of glycoproteins, products of *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* 326: 102-105.

- Tanhuanpää, P.K., Vilkki, J.P., Vilkki, H.J.** (1995): Association of a RAPD marker with linolenic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome* 38: 414-416.
- Teutonico, R.A., Osborn, T.C.** (1994): Mapping of RFLP and quantitative trait loci in *Brassica rapa* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea*, and *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 86: 885-894.
- Thompson, K.F.** (1968): Classified S-Alleles for Brassica Breeders. In: G.E. Dixon (ed.), Brassica meeting of Eucarpia 1968, Wellesbourne, Warwick, 25-28.
- Tommasini, L., Batley, J., Arnold, G.M., Cooke, R.J., Donini, P., Lee, D., Law, J.R., Lowe, C., Moule, C., Trick, M., Edwards, K.J.** (2003): The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl Genet* 106: 1091-1101.
- Udall, J.A., Quijada, P.A., Osborn, T.C.** (2005): Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* 169: 967-979.
- Uzunova, M., Ecke, W., Weißleder, K., Röbbelen, G.** (1995): Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theor Appl Genet* 90: 194-204.
- Walsh, J.A., Sharpe A.G., Jenner, C.E., Lydiate D.J.** (1999): Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of *TuRB01*. *Theor Appl Genet* 99: 1149-1154.
- Watanabe, M., Nou, I.S., Takayama, S., Yamakawa, S., Isogai, A., Takeuchi, T., Hinata, K.** (1992): Variations in and inheritance of glycoprotein in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Plant Cell Physiol.* 33: 343-351.
- Xu, F.S., Wang, Y.H., Meng, J.** (2001): Mapping boron efficiency gene(s) in *Brassica napus* using RFLP and AFLP markers. *Plant Breed* 120: 319-324.
- Zhao, J., Meng, J.** (2003): Genetic analysis of loci associated with parental resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 106: 759-764.
- Zhi-wen, L., Ting-dong, F., Jin-xing, T., Bao-yuan, C.** (2005): Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 110: 303-310.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ACGM	Amplified consensus gene marker
AI	autoinkompatibilita, autoinkompatibilní
AK	autokompatibilita, autokompatibilní
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequences
CHA	chemical hybridizing agens
CMS	cytoplasmic male sterility
DGMS	dominant genic male sterility
DUS	Distinctness, Uniformity and Stability
EST	expressed sequence tag
GMS	genic male sterility
GSI	gametophic self-incompatibility
MAS	marker-assisted selection
PCR	polymerase chain reaction
QTL	quantitative trait loci
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RGA	resistance gene analog
RGMS	recessive genic male sterility
SCAR	sequence characterized amplified region
SCR	<i>S</i> -locus cysteine-rich protein
SLG	<i>S</i> -locus glycoprotein
SP11	<i>S</i> -locus protein 11
SRK	<i>S</i> -locus receptor kinase
SSR	simple sequence repeat
STS	sequence-tagged site