

J I H O Č E S K Á U N I V E R Z I T A
Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a
České Budějovice



Disertační práce

**Využití molekulárních markerů ve šlechtění
hybridní řepky**

Autor:

Ing. Tomáš Nix

Školitel:

Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

ČESKÉ BUDĚJOVICE

2008

Poděkování:

Velmi děkuji svému školiteli Prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za pomoc, podporu, vedení a rady, které mi poskytoval v průběhu celého doktorského studia a během zpracování této práce.

Dále bych chtěl poděkovat techničce Vlastě Allizarové a celému kolektivu Biotechnologického centra Zemědělské fakulty, zejména Ing. Janě Žaludové, Ph.D.

Práce v laboratoři byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (GAČR H-160, GAČR H-042), NAZV 1G46061 a Grantovou agenturou Jihočeské univerzity.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky“ vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 27. listopadu 2008

Ing. Tomáš Nix

Abstrakt:

Předkládaná disertační práce s názvem "Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky" je rozčleněna do kapitol Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky a diskuse, Závěr, Přehled použité literatury a Seznam použitých zkratk.

V úvodu je pojednáno o významu řepky a o situaci šlechtění této plodiny v České republice. Literární přehled se zabývá nejprve velmi stručně původem a systematikou řepky, dále pak obecně šlechtěním řepky, zejména hybridním šlechtěním. Je zde nastíněna problematika řízeného opylování u řepky. Větší pozornost je věnována autoinkompatibilitě - mechanismu pro zabránění samosprášení, který lze použít v hybridním šlechtění řepky. Podrobněji je zde popsán S-lokus, kde leží geny, které jsou důležité v autoinkompatibilní reakci. Druhá část literárního přehledu je věnována otázce rezistence řepky k houbové chorobě *Phoma lingam*, především molekulární podstatě a hledání markerů rezistence.

Byly vytyčeny dva základní cíle práce. Prvním je analýza genu *SLG* a stanovení možností jeho využití jako molekulárního markeru autoinkompatibility u řepky. Druhým cílem je hledání molekulárního markeru odolnosti řepky k houbové chorobě *Phoma lingam*.

Materiálem pro analýzy byly odrůdy (spektrum 24 odrůd), autoinkompatibilní linie (a jejich kříženci) a dihaploidní linie řepky. Pro vyhodnocení fenotypového projevu autoinkompatibility sloužil semenný test, pro hodnocení napadení patogenem *Phoma lingam* laboratorní test rezistence. Pro genetické analýzy byly použity tyto molekulárně-biologické metody: PCR, PCR-RFLP, RAPD, klonování a sekvenování.

S úspěchem se podařilo rozlišit AI a AK rostliny na základě amplifikace genu *SLG* I. K odlišení (resp. selekci) AK rostlin se *SLG* I ukázal jako vhodný marker. V opačném případě se bohužel použít nedá, protože mezi rostlinami s nepřítomností *SLG* I byly i rostliny částečně kompatibilní.

Bylo prokázáno, že většina současných odrůd má ve svém genomu dominantní alelu *SLG* genu třídy I - alelu *A10*. Podrobnější analýzy *SLG* I genu u odrůd Global a Topas odhalily existenci většího množství různých alel *SLG* I genu.

U všech analyzovaných odrůd byla potvrzena alela *S15* genu *SLG* II. Podařilo se osekvenovat funkční alelu *SLG* genu třídy II z genomu *Brassica rapa* u AI linií Tandem a Start. Předpoklad, že dvě vzájemně kompatibilní linie Star a Tandem mají odlišné alely *SLG* II genu se nepotvrdil. Linie WRG má však alelu jinou. Snahou bylo ověřit možnosti odlišení jednotlivých alel pomocí metody PCR-RFLP a stanovit využitelnost této metody pro rutinní testování.

PCR-RFLP genu *SLG II* může u materiálu, kde byly na základě sekvenční analýzy prokázány rozdílné alely, sloužit k odlišení jednotlivých haplotypů a stanovení hybridnosti po křížení. RAPD metoda se pro stanovení hybridnosti ukázala jako méně vhodná.

Co se týká markerů odolnosti k *Phoma lingam*, RAPD metoda velmi dobře odlišila náchylné a odolné genotypy donorových rostlin. Byla vytvořena sada DNA (RAPD) fingerprintů, na jejichž základě byl odvozován marker pro rezistenci k fomě. Pomocí metody RAPD fingerprintingu nebyl prokázán výrazný rozdíl mezi rezistentním a náchylným fenotypem v populaci rostlin mikrosporových regenerantů z F₁ kříženců rostlin odrůd Capitol, Jesper, Mohican, Orkan (donorové rostliny byly odlišeny, ale markery nesegregovaly přesně s fenotypem ve štěpící populaci). Nejlépe se jevil RAPD marker s OPA 14 primerem použitým pro amplifikaci, nerozlišuje sice stoprocentně odolné a náchylné jedince, ale částečná shoda byla nalezena. Dle souboru získaných dat byly pomocí clusterové analýzy stanoveny genetické vzdálenosti mezi jednotlivými odrůdami.

Abstract:

Name of this thesis is „Application of Molecular markers in hybrid breeding of *Brassica napus*“ and it's divided into this sections: Introduction, Literature, Aims, Materials and Methods, Results and Discussions, Conclusions, References and List of Abbreviation.

In Introduction is treated about consequence of *Brassica napus* and about situation of breeding this crop. Literature is about origin and classification, next about breeding of oilseed rape, particularly hybrid breeding, control pollination. Main part is about autoincompatibility-mechanism to prevention self-pollination, which is used in hybrid breeding.

There is at full length described S-locus, where is genes for selfcompatibility. Second part of this research is about resistance in *Brassica* to *Phoma lingam* especially searching of molecular markers of resistance. First of the two basic aims was analysis of *SLG* gene and its application as molecular marker of selfcompatibility. Second aim is searching of molecular marker of resistance in *Brassica napus* to *Phoma lingam*.

Varieties (spectrum of 24 varieties), selfcompatible lines and dihaploid lines of *Brassica napus* were used for analysis. The evaluate of phenotype seed test was used and laboratory test of resistance was used for evaluation of resistance to *Phoma lingam*. Following methods, PCR, PCR-RFLP, RAPD, cloning and sequencing, were used for genetic analysis. Amplification of *SLG* gene led to success distinction of SI and SC plants. *SLG* I gene appears like possible molecular marker for selection AC plants.

Most of the cultivars has in genome a dominant allele of *SLG* I gene – allele *A10*. In two SC cultivars Topas and Global there are more of alleles of *SLG* I.

In all cultivars was confirmed allele *S15* of *SLG* II gene. The sequences of *SLG* II gene in two different compatible lines were the same. It does not confirm that alleles of *SLG* II gene in lines Start and Tandem are different. In line WRG there is a different allele of *SLG* II gene. Method PCR-RFLP was tested for classification of S-haplotypes. PCR-RFLP of *SLG* gene is a good marker for classification of S-haplotypes and for detection of ratio of hybrid seeds. RAPD does not a good method for this application.

RAPD method is effective for distinguish sensitive and resistant genotypes of donor plants in study of resistance to *Phoma lingam*. Marker for resistance to *Phoma lingam* was derived from DNA (RAPD) fingerprints. Resistant and sensitive plants is possible to distinguish after RAPD analyses with primer OPA14.

Obsah:

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1. Původ a systematika řepky.....	10
2.2. Historie šlechtění řepky.....	13
2.3. Hybridní šlechtění řepky.....	13
2.3.1. Mechanismy pro řízené opylení.....	15
2.3.2. Molekulární základ autoinkompatibility.....	18
2.4. Rezistence řepky k <i>Phoma lingam</i>	21
2.4.1. Podstata rezistence.....	22
2.4.2. Molekulární markery rezistence.....	23
3. CÍLE PRÁCE.....	25
4. MATERIÁL A METODY.....	26
4.1. Charakteristika rostlinného materiálu.....	26
4.2. Semenný test.....	26
4.3. Laboratorní test hodnocení odolnosti.....	28
4.4. Extrakce DNA.....	28
4.5. DNA analýzy.....	30
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
5.1. Analýza genů <i>SLG</i> a jejich využití jako molekulárních markerů.....	35
5.1.1. <i>SLG</i> I jako selekční marker autoinkompatibility.....	35
5.1.2. Analýza alel genu <i>SLG</i> I.....	38
5.1.3. Analýza alel genu <i>SLG</i> II.....	45
5.2. Hledání molekulárního markeru odolnosti k <i>Phoma lingam</i>	59
6. ZÁVĚR.....	65
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	75

1. ÚVOD

Mezi sedm světově nejvýznamnějších olejnin patří právě řepka. Roční světová produkce semen řepky činí necelých 40 mil. tun, to je zhruba 1/6 celkové produkce olejnatých semen na světě. Největšími producenty řepky je v současnosti Čína, země Evropské unie a Kanada (BARANYK 2000). V České republice zůstávají olejninu spolu s obilovinami hlavními tržními plodinami.

Význam této plodiny a možnost jejího využití je značný. Nejvýznamnějším produktem řepky je samozřejmě olej, který je výchozí surovinou pro nespočet různorodou škálu výrobků. Řepka olejná má mnohostranné využití nejen jako potravinářská surovina, ale také ve farmacii, oleochemii, při výrobě biopaliv či jako energetická plodina.

Za připomenutí stojí také dva důležité aspekty - obnovitelnost tohoto zdroje a snadnější biologická odbouratelnost výrobků z rostlinných olejů oproti výrobkům z olejů minerálních (BARANYK 2000).

V posledních několika letech se metody a techniky šlechtitelské práce výrazně změnily. Stále více se při šlechtitelské práci uplatňují metody molekulární biologie. Nástup molekulární biologie do oblasti šlechtění započal mapováním RFLP markerů do genetických map hospodářsky významných plodin. Objev a vylepšení metody PCR umožnilo rozvoj a použití velkého množství genetických markerů a sekvenování. S přibývajícím množstvím informací o funkcích jednotlivých genů v genomu rostlin budou molekulární metody klíčové pro získání požadovaných vlastností. Jakmile se podaří identifikovat alespoň část genů, které podmiňují ekonomicky významné kvantitativní znaky, velmi vzroste význam výběru na základě markerů.

Šlechtění řepky v České republice je v současnosti stále více aktuální problém. Všechny šlechtitelské subjekty zabývající se šlechtěním řepky v České republice jsou sdruženy pod asociací „Česká řepka“. Tato asociace spolupracuje s Výzkumným ústavem rostlinné výroby Praha-Ruzyně a s Biotechnologickým centrem Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Společné úsilí posledních deseti let přineslo úspěch v registraci 4 nových odrůd - „Oponent“, „Aplaus“, „Opus“ a „Oksana“.

Zaměření výzkumné a šlechtitelské činnosti sdružení Česká řepka je dle KOPRNY (2008) cíleno do následujících oblastí:

- 1) Tvorba nových materiálů s požadovanými parametry výnosu a kvality včetně produkce

dihaploidů

2) Hybridní šlechtění

A) Na bázi cytoplazmatické samčí sterility *Ogu*-INRA

B) Na bázi sporofytické autoinkompatibility (AI)

C) Na bázi systému cytoplazmatické samčí sterility SHAAN 2

3) Šlechtění na změněnou kvalitu oleje a šrotu

4) Šlechtění na rezistenci vůči chorobám, škůdcům a abiotickým stresům.

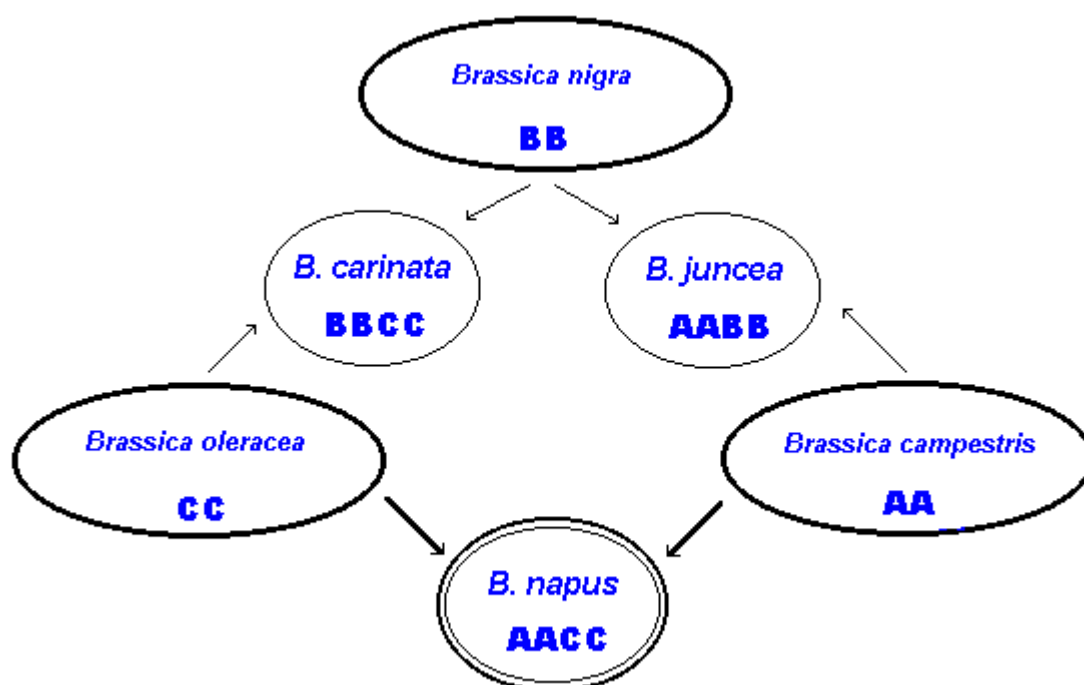
Na Zemědělské fakultě v Českých Budějovicích (dříve na katedře pícninářství, dnes v Biotechnologickém centru) má výzkum v oblasti řepky dlouholetou tradici. Během svého doktorandského studia jsem se zabýval zejména molekulárními markery u řepky, a tím alespoň částečně přispěl do celého velkého procesu při šlechtění řepky. Dosažené výsledky předkládám v této disertační práci.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Původ a systematika řepky

Řepka *Brassica napus* (brukev řepka olejka - *B. napus* L. subsp. *napus*) má $2n = 38$ chromozomů, které představují dva složené genomy - 10 chromozomů genomu AA pochází z *Brassica campestris* L. (nynější platný název *B. rapa* L. subsp. *oleifera* (DC.)METZGER) a 9 chromozomů genomu CC z *B. oleracea* L. (FÁBRY ET AL. 1992, LABANA A GUPTA 1993). Schéma znázorňující původ řepky je uvedeno na obrázku 2.1.

Obr. 2.1.: Původ řepky



Cytologické studie a experimentální křížení vedly k hypotézám o příbuzenských vztazích druhů v rámci rodu *Brassica* a k domněnce o původu řepky. Kulturní druhy rodu *Brassica* se podle počtu chromozomů rozdělují do třech základních skupin s genomy A, B, C. U monogenomických druhů se na základě chování chromozomů v průběhu mitózy, na základě cytologických studií, uvažuje o jejich společném, nyní vyhynulém, předkovi se základním chromozómovým číslem $x = 5$ nebo 6 (LABANA A GUPTA 1993). Základní druhy

vznikaly z tohoto předka procesem autopolyloidie následované eliminací některých chromozomů a strukturálními přestavbami (DOWNEY, KLASSEN a STRINGAM 1980, RÖBBELEN 1985).

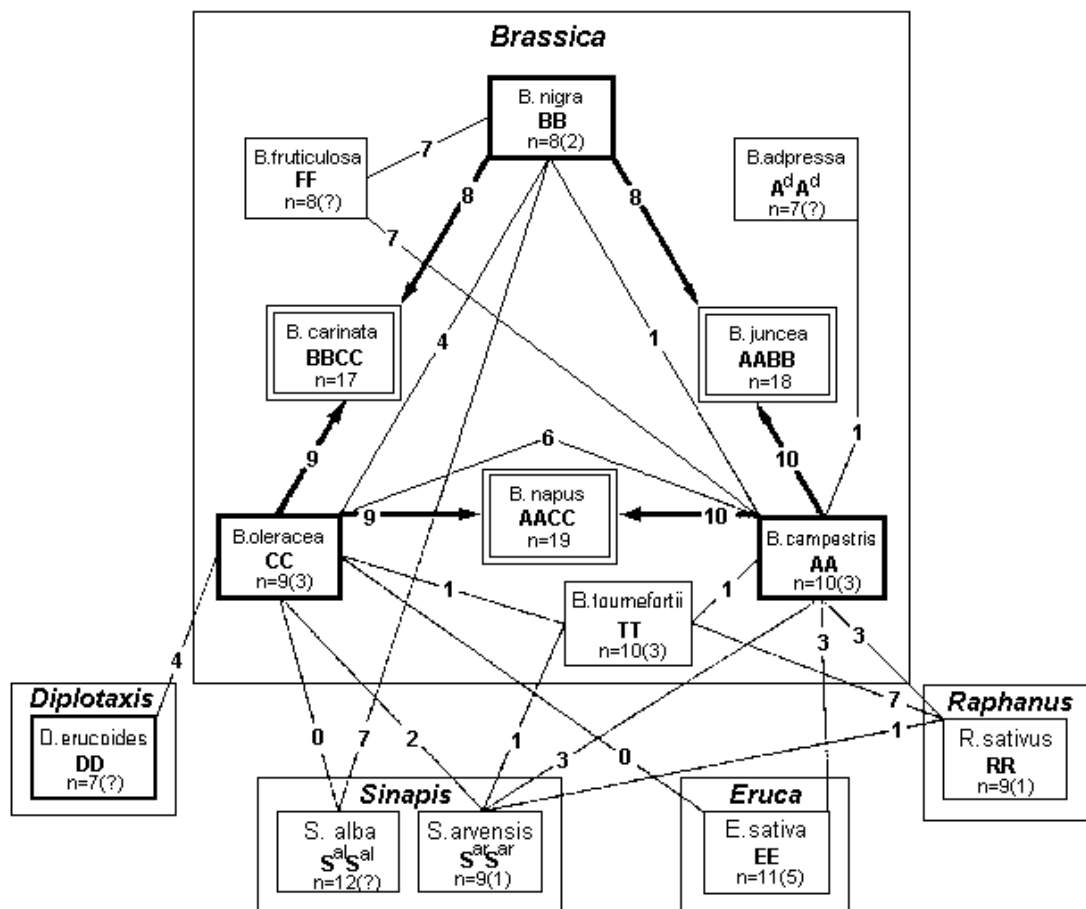
Kombinací těchto základních skupin náhodným spontánním křížením rodičovských forem a následnou amfidiploidizací vznikly další skupiny (MCNAUGHTON 1976, RÖBBELEN 1985). Přehled základních a amfidiploidních skupin druhů rohu *Brassica* je uveden v tabulce 2.1. Důkaz o tomto hybridním původu kulturní řepky byl podán nejprve cytotaxonomickými experimenty MORINAGA (1934), doplněn a potvrzen pracemi U (1935), a později doplněn šlechtitelskými a hybridizačními experimenty (FRANSEN 1943, 1947). Důkaz o polyfyletickém původu řepky je v posledních letech potvrzován i na základě molekulárně genetické analýzy, pomocí RFLP analýzy jaderné DNA, ctDNA a mtDNA (SONG a OSBORN 1992) nebo na základě RAPD markerů (DEMEKE, ADAMS a CHIBBAR 1992). Dříve byla snaha využívat postup resyntézy řepky z „původních“ rodičovských forem, zejména jako šlechtitelské strategie pro rozšíření genetické variability ve šlechtění řepky (SCHENCK a WOLF 1986, SUNDBERG a GLIMELIUS 1986, AKBAR 1989, CHEN a HENEEN 1989). Bylo dosaženo několika úspěchů, byly získány jarní i ozimé řepky, např. se žlutým semenem (BECHYNĚ 1988).

Tab. 2.1.: Přehled základních a amfidiploidních skupin druhů rodu *Brassica*.
(dle FÁBRY ET AL. 1992)

Skupina	Počet chromozómů (n)	Genomy	Druh
I.	10	AA	<i>B. campestris</i>
II.	8	BB	<i>B. nigra</i>
III.	9	CC	<i>B. oleracea</i>
IV.	18	AABB	<i>B. juncea</i>
V.	19	AACC	<i>B. napus</i>
VI.	17	BBCC	<i>B. carinata</i>

Rodičovské druhy řepky se velice obtížně kříží, zejména z důvodu deficiencie endospermu, která vede k abortu embrya. Spontánní výskyt *de novo* „syntetizované“ řepky je extrémně řídký, nejen pro bariéry při oplozování a při vývinu embrya, ale např. i pro odlišnosti v barvě a utváření květu rodičovských komponent. „Divoká“ řepka má pravděpodobně původ ve Středomoří, v oblasti, kde se překrývají oblasti výskytu *B. oleracea* a mnohem rozšířenější *B. rapa*. Na základě studia rozsahu variability morfologických forem, porovnání s rodičovskými formami, se usuzuje, že *B. napus* vznikla opakovaně několikrát na základě spontánní vzdálené hybridizace odlišných forem *B. rapa* a *B. oleracea* (McNAUGHTON 1976, RÖBBELEN 1985, FÁBRY ET AL. 1992). Vzhledem ke svému fylogenetickému původu řepka zahrnuje jen rozsah variability poddruhů nebo variet *B. oleracea* a *B. campestris* (*B. rapa*), které byly zúčastněny v původním křížení, a genetická variabilita je u *B. napus* poněkud limitována. Složitější příbuzenské vztahy u brukvovitých rostlin ukazuje obrázek 2.2. (dle RÖBBELEN 1985).

Obr. 2.2: Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Brassica* a některých příbuzných taxonů.



2.2. Historie šlechtění řepky

Řepka olejka (*Brassica napus*) je spontánní amfidiploidní druh s haploidním počtem chromozomů $n=19$ (10+9), který vznikl hybridizací druhů *B. oleracea* (genom C) a *B. rapa* (syn. *B. campestris*) - genom A (FÁBRY ET AL. 1992).

Předpokládaný počátek pěstování, tím tedy i primitivní šlechtění, řepky na našem území se datuje do období 8-10 století. Některé staré prameny (např. Ottův naučný slovník) uvádějí zavedení pěstování řepky do Rakouska - Uherska ve větší míře koncem 18. století. Hovoří se zde také o využití oleje brukvovitých (řepky) jako oleje pro výrobu mýdel a hlavně pro výrobu lampového oleje. Pro potravinářské využití se tento olej nepoužíval, kvůli jeho „hořké chuti“. V počátcích pěstování olejnin se ovšem nerozlišoval botanický druh řepky a řepice (zhruba do konce 18. století).

Velkým mezníkem ve šlechtění řepky byl rok 1960, kdy byly nalezeny Stefansonem v Kanadě rostliny bez kyseliny erukové. Tyto mutace daly základ vyšlechtění prvních odrůd s nízkým obsahem kyseliny erukové označené jako jednonulové („0“). Dalším úspěchem bylo nalezení genového zdroje s nízkým obsahem glukosinolátů v polské odrůdě „Bronowski“. V sezoně 1983/84 bylo zahájeno pěstování dvounulových odrůd („bezerukové s výrazně sníženým množstvím glukosinolátů“) (VAŠÁK 1994).

V současné době se šlechtí řepky třínulové (žlutosemenná, se sníženým obsahem vlákniny), čtyřnulové (redukovaný obsah kyseliny linolenové), řepky „E0“ s vysokým obsahem kyseliny erukové a nízkým podílem GSL (existuje několik odrůd), hybridní, transgenní a hybridní transgenní (VAŠÁK ET AL. 1997).

2.3. Hybridní šlechtění řepky

Šlechtění hybridů je nejúčinnější metodou ke genetickému zlepšení užitné hodnoty pěstovaných plodin. Jejich předností je především větší fyziologická výkonnost a větší odolnost k nepříznivým podmínkám prostředí. Při tvorbě hybridních odrůd dochází k produkci osiva z kontrolovaného křížení dvou komponent. Veškeré potomstvo takového křížení je tudíž heterozygotní. Čím jsou tyto výchozí rodičovské komponenty odlišnější, tím je také vyšší míra heterozygotnosti potomstva (NESVADBA A MACHÁŇ 1998).

Hybridní šlechtění je tím výhodnější, čím vyšší je heteroze a čím větší je hodnota specifické kombinační schopnosti ve šlechtitelském materiálu. Obecně můžeme tedy heterozu označit jako biologický jev zvýšené vitality a produktivity F_1 generace po zkřížení geneticky rozdílných genotypů či linií. Základním požadavkem je však existence hybridního

mechanismu, tzn. ekonomicky výhodného postupu, který vede ke kontrolované hybridizaci mateřského a otcovského materiálu a zisku hybridního osiva (NESVADBA A MACHÁŇ 1998).

Hybridní šlechtění spadá do oblasti šlechtitelských metod heterozního křížení. Využívá heteroze po zkřížení rodičů s dobrou kombinační schopností. Rodičovské komponenty jsou zpravidla odrůdy nebo inzuchtované linie. Maximálního heterozního efektu je dosaženo v F₁ generaci. Patří sem šlechtění meziliniových hybridů a syntetických populací.

Počet hybridních odrůd u polních i zahradních plodin se neustále zvyšuje, přesto u mnohých plodin není hybridní šlechtění zavedeno, protože chybí vhodný mechanismus zajišťující kontrolované opylení. Podíl hybridních odrůd řepky stoupl od roku 1998/99, kdy se začaly hybridní odrůdy u nás pěstovat na 25,2 % ploch řepky u zásevu v roce 2006/07 (BARANYK 2007).

Podle rodičovských komponent lze hybridy rozdělit na meziodrůdové, meziliniové, odrůdo-liniové, modifikované, sesterské a zpětné. Podle počtu rodičovských komponent rozlišujeme hybridy jednoduché, složité a dvojité.

Produkce hybridního osiva generace F₁ meziodrůdovou či meziliniovou hybridizací se většinou zajišťuje systémem střídavých pásů, tj. výsevem mateřského komponenta (i s CMS) jedním secím strojem a výsevem otcovského opylovače druhým secím strojem, ve vhodném poměru (3 : 1, 6 : 2). Po opylení se opylovač odstraňuje a osivo se získává jen z rostlin mateřského komponenta, což zajistí sklizeň čistého hybridního osiva .

Dobrym předpokladem pro rentabilní uplatnění výroby hybridního osiva řepky je její vysoký rozmnožovací koeficient a na druhé straně nízká potřeba osiva na jednotku plochy. Výnos semene u řepky může být vlivem heterozního efektu o 60 - 70 % vyšší oproti rodičovským liniím (GRAND A BEVERSDORF 1985, LEFORT-BUSON ET AL. 1987). Hybridní kombinace dosahují 15 - 20 % přírůstku v porovnání s nejlepšími liniiovými odrůdami (BANKS A BEVERSDORF 1994). Je třeba si uvědomit, že základem úspěšnosti výroby hybridního osiva je v konečné fázi opylení mateřské linie pylem rostlin linie otcovské, aby byl co největší podíl hybridního potomstva. Značnou nevýhodou je převažující samosprašnost a jen částečná cizosprašnost řepky. Řepka je fakultativně cizosprašná z 20-40 %. Protože výroba hybridního osiva s ruční kastrací je u řepky vyloučena, hledají se mechanismy umožňující řízené opylování.

2.3.1. Mechanismy pro řízené opylení

Cytoplazmatická pylová sterilita (Cytoplasmatic Male Sterility, CMS)

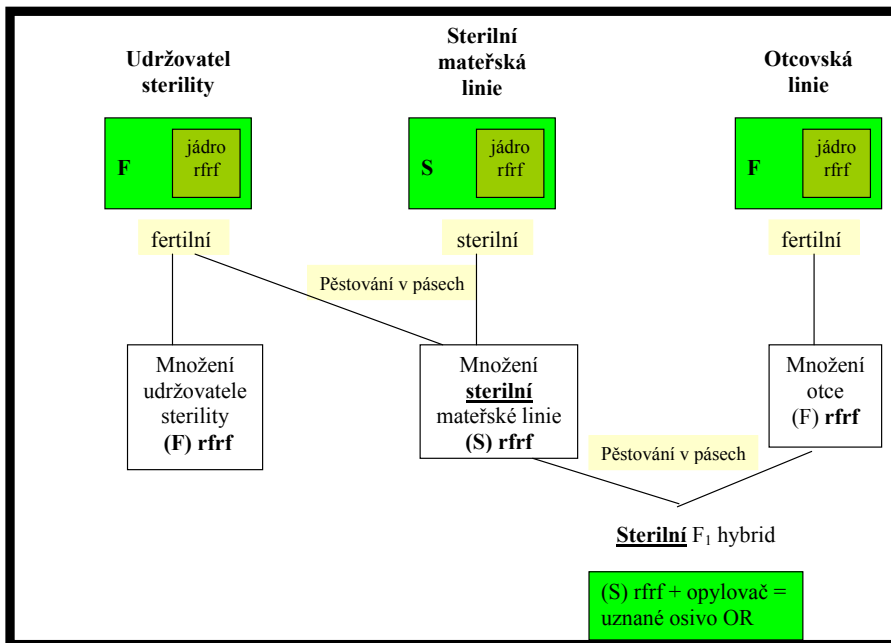
V literatuře je popsáno asi sedm typů CMS u řepky, např.: nap, ogu, pol (FU A YANG 1998). Rostlina nevytváří vůbec pyl nebo vytváří pyl zcela nefunkční v důsledku mutace jaderných genů fertility (*Rf* na *rf*). Projevuje se nejčastěji deformací prašníků až jejich zakrněním. Jedná se o interakci mezi určitým typem buněčné protoplazmy (S, F) a geny pro sterilitu (*rf*) v chromozomech. Genotyp rostliny pylově sterilní je S *rf rf*. Geneticky identická rostlina s jinou protoplazmou zůstává fertíl (F *rf rf*), vzniklé zygoty budou mít stejnou protoplazmu jako mateřská rostlina a znaky pro sterilitu jako oba rodiče. Výsledkem je opět pylově sterilní rostlina (S *rf rf*). Tento systém umožňuje jednak udržovat a současně namnožovat pylově sterilní linii, ale také ji kombinovat s jakoukoli jinou fertíl (typu F *Rf Rf* nebo F *Rf rf*) a tím produkovat hybridní osivo na bázi CMS s možností obnovy pylové fertility. Rostliny s restaurátorskými geny *Rf* v jádře po zkřížení se sterilní rostlinou obnovují (restaurují) fertilitu a fertíl rostliny mají genotypy pak typu S *Rf Rf* nebo S *Rf rf* (HANSON 1991).

V praktickém využívání CMS přetrvává i nadále problém vhodných udržovatelů sterility a hlavně získání účinných obnovitelů fertility s *Rf* geny bez negativního ovlivnění dalších znaků a vlastností. Sterilní cytoplazma může mít negativní vliv na výnosy a některé systémy nemusí být stabilní v různých přírodních podmínkách (TU ET AL. 1999). Vysoký obsah GSL u linií obnovitele je způsoben přenosem genu obnovy fertility z ředkve do řepky (DELOURME ET AL. 1998, RENARD ET AL. 1997).

V současnosti jsou v Evropě nejvíce rozšířené hybridní systémy MSL (Mänlicher Sterilität Lembke) a CMS (Cytoplasmatic Male Sterility) *Ogu*-INRA. Výhodou systému *Ogu*-INRA oproti rozšířenému systému MSL je vysoká stabilita samčí sterility a relativně nízké náklady na výrobu osiva (FRAUEN ET AL. 2001). Naopak nevýhodou tohoto systému je nespolehlivá obnova fertility a problémy s obsahem GSL u obnovitele. Oba systémy mají omezenou genetickou základnu.

Schéma 2.1. znázorňuje výrobu hybridního osiva na bázi CMS typu *ogu*/INRA. V tomto případě se jedná o kompozitního pylově sterilního hybridu, do osiva hybridní odrůdy musí být přidáno asi 20 % opylovače.

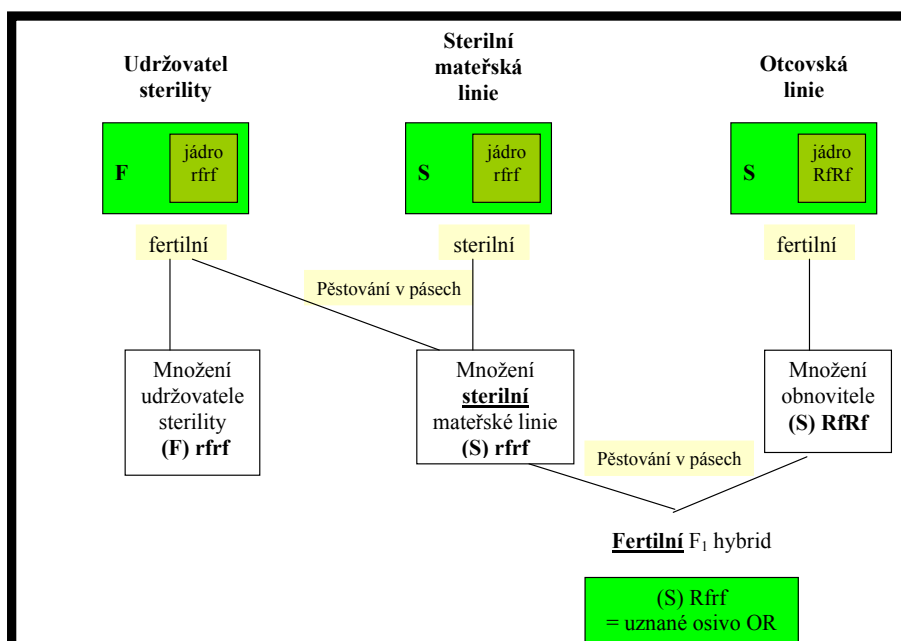
Schéma 2.1.: „ogru/INRA“ sterilní hybridy (typ „Synergy“) (Upraveno podle BARANYK 2000).



Jaderná pylová sterilita (Genic Male Sterility , GMS)

Sterilita je vyvolána pouze jadernými geny a podmíněna mutovaným genem fertility ($Rf \rightarrow rf$). Existují minimálně dva typy jaderné pylové sterility, dominantní a recesivní. Pro šlechtění hybridních odrůd využívající tento systém postačí pouze dvě linie. Nevyskytuje se zde negativní vliv cytoplazmy na výnos (TU ET AL. 1999).

Schéma 2.2.: „MSL“ fertilní hybrid („typ Pronto“) výroba hybridního osiva typu MSL (Male Sterility Lembe), který je v konečné fázi plně fertilní. (Upraveno podle BARANYK 2000).



Sporofytická inkompatibilita

Autoinkompatibilita (AI) byla u řepky popsána roku 1953. Jde o úplnou inhibici pylové láčky při samoopylení. V tomto systému aktivní glykoproteiny na povrchu blizny zastaví růst pylové láčky u vlastního pylu. Cizí pyl může růst dál. Každý glykoprotein je geneticky definován jednou S-alelou .

Pro překonání AI při množení inbredních linií je známo několik metod, není zde tedy zapotřebí žádného udržovatele sterility, jako je tomu u systémů využívajících CMS. Literatura uvádí různé metody překonání AI, je to například postřik chloridem sodným (MONTEIRO ET AL. 1998, FU ET AL. 1992); dále pak expozice oxidem uhličitým (NAKANISHI A HINATA 1975, PALLOIX ET AL. 1985).

AI reakce souvisí s blokadou hydratace pylu stejného haplotypu (STONE ET AL. 1999). Je třeba podotknout, že hydratace je blokována pouze v místě kontaktu pylu a papilární buňky. Při opylení směsí inkompatibilních a kompatibilních pylových zrn jsou inkompatibilní zrna blokována, zatímco kompatibilní na stejné papilární buňce normálně hydratují (SARKER ET AL. 1988). Popsanou hydratační blokádu lze překonat např. zvýšenou vlhkostí, avšak růst pylu je stejně v pozdějším stádiu zastaven (DEARNALEY ET AL. 1997). Jedná se o klasický důkaz, že AI reakce u rodu *Brassica* má více kontrolních bodů (HESLOP-HARRISON 1975).

Systém využívající autoinkompatibilitu se dnes běžně používá pro produkci hybridů různých druhů brukvovité zeleniny. První hybridní odrůdy jarní řepky, vytvořené na základě AI, byly zavedeny v Kanadě, šlechtění ozimých hybridů se rozvíjí v SRN, Anglii, Dánsku i v ČR. U nás se AI hybridy zatím nepěstují. První materiály založené na AI byly přihlášeny do odrůdových zkoušek i v České republice (SOBOTKA 2001).

Výrazný heterozní efekt u jarních AI hybridů zjistil MA ET AL. (2003). Ve srovnání s liniemi opylovačů došlo u 15 experimentálních hybridů k průměrnému zvýšení výnosu hybridů o 380 kg na lokalitě Svalöv (Švédsko) a o 556 kg na lokalitě Gansu (Čína). Procentický nárůst výnosu semene byl 17,04 %, resp. 19,91 %. AI hybridy jsou schopny konkurovat dalším hybridním systémům používaným u ozimé řepky. O tomto svědčí i výnosy experimentálních hybridů z roku 2007, kdy ve srovnání s hybridními kontrolami byl výnos některých AI hybridů vyšší až o 11,8 % (KOPRNA 2007).

Brassica rapa i *B. oleracea*, druhy z nichž vznikla kulturní řepka, jsou přirozeně inkompatibilní. Tři diploidní druhy rodu *Brassica*; *B. rapa* (AA, $2n = 20$), *B. oleracea* (CC, $2n = 18$), *B. nigra* (BB, $2n = 16$); jsou autoinkompatibilní, ale amphidiploidní druhy; *B. napus* (AACC, $2n = 38$), *B. juncea* (AABB, $2n = 36$) a *B. carinata* (BBCC, $2n = 34$) jsou obecně

autokompatibilní (OLLSON 1960). Existují tedy různé cesty získání autoinkompatibilní řepky, a to třeba selekcí rostlin z populací řepky klasickým šlechtěním nebo pomocí introdukcí S-alel z rodičovských druhů do kulturní řepky pomocí resyntézy. Současné odrůdy řepky však především díky šlechtění a výběru mají ve svém genomu nefunkční alely pro AI. KUČERA ET AL. (1995) uvádí výskyt AI rostlin u současných odrůd okolo 0,1 %. HAVEL (1994) vycházel z originálních zdrojů AI nalezených v populacích běžně pěstovaných odrůd řepky. Výskyt AI rostlin v populacích dvounulových řepok uvádí 0,3 – 3,9 %.

Východiskem pro získání AI linií řepky by mohla být selekce AI jedinců ze starých odrůd a křížení těchto linií se současnými odrůdami. Toto však přináší řadu problémů, především vnesení nežádoucích znaků a snížení kvality. Předpokládá se také vazba genů zodpovědných za AI s geny pro zvýšený obsah GLS. Jak uvádí KUČERA ET AL. (1995), je u AI linií vysoký obsah glukosinolátů, přestože jsou odvozeny z výchozích materiálů s dvounulovou kvalitou. Dalším řešením by mohlo být přenesení zmiňovaných genů do řepky z *B. campestris*, popř. *B. rapa.*, pomocí resyntézy nebo transgenoz.

Existuje také možnost přenosu genu pro AI společně s geny rezistence k určitému typu herbicidu do mateřské linie. V praxi by to znamenalo velkou výhodu v tom, že pro likvidaci otcovské komponenty by postačil postřik tímto herbicidem.

Chemicky indukovaná sterilita

Do této skupiny patří gametocidy, což jsou chemická činidla, která vyvolávají sterilitu prašníku mateřské rostliny. U druhů s delším obdobím kvetení, jako je právě řepka, však nelze tento postup využít (ARNISON 1997). Patří sem např. Certation, chemická látka, která způsobuje rychlejší prorůstání pylu geneticky odlišné rostliny k vajíčku oproti pylu vlastnímu nebo pylu podobného haplotypu. Tato látka se nepoužívá.

2.3.2. Molekulární základ autoinkompatibility

Autoinkompatibilita (AI) představuje pro rostliny možnost, jak zabránit opylení vlastním pylem. Řepka olejná (*Brassica napus* L., convar. *napus*, syn. var. *arvensis* (LAM.)THELL.) je fakultativně cizosprašná, samosprašnost převažuje. Řepka je allotetraploid (AACC) a skládá se z genomů *Brassica rapa* (AA) a *Brassica oleracea* (CC). Ve snaze zvýšit produkci je šlechtění zaměřeno na šlechtění cizosprašných linií pro tvorbu F₁ hybridů. Pro produkci hybridního osiva je nutné zamezit samosprašení. Při řešení tohoto

úkolu se využívá genově a cytoplazmaticky založené pylové sterility. Další možnost u řepky představuje již zmíněná autoinkompatibilita, systém zabraňující opylení vlastním pylem (GOWERS 1989, HAVEL 1996). U druhů *Brassica rapa* a *Brassica oleracea* se vyskytuje přirozeně, naproti tomu u *B. napus* je výskyt ojedinělý, např. u speciálních linií nebo u některých rostlin starých odrůd.

Autoinkompatibilita je kontrolována jediným úsekem DNA tzv. S-lokusem, který má velký počet alel (OCKENDON 1974, DE NETTANCOURT 1977). Počet alel u rodu *Raphanus* se odhaduje na 34 (SAMPSON 1957), u *Brassica rapa* na 30 (NOU ET AL. 1993) a více než na 50 u *Brassica oleracea* (BRACE ET AL. 1994). S-alely u rodu *Brassica* jsou podle svého fenotypového účinku na základě klasické genetické analýzy rozděleny na skupinu alel s vysokým stupněm dominance a skupinu považovanou za recesivní (NASRALLAH ET AL. 1991).

Velice zjednodušeně lze průběh autoinkompatibilní reakce popsat asi takto: Po dopadu pylového zrna se musí *SP11* protein, resp. *SCR* protein (SUZUKI ET AL. 1999), přesunout do papilárních buněk blizny, čemuž napomáhají *SLG* a *SLRI* proteiny (DIKINSON 1995). *SP11*, je-li stejného haplotypu, se pravděpodobně naváže k aminokyselinovým zbytkům uvnitř extracelulární S-domény *SRK*. Po navázání ligandu dojde k dimerizaci *SRK*, a tím je vyvolána AI odpověď (NASRALLAH ET AL. 1994). Tyto signální události spouští kaskádu reakcí, které vedou ke konečné inhibici prorůstání pylové láčky a zamezení opylení vlastním pylem, resp. pylem stejného haplotypu. Pro ujasnění je důležité podotknout, že *SP11/SCR* působí jako samčí determinant a je lokalizován především v pylovém obalu, zatímco k expresi *SRK* dochází převážně v bliznách. Obecně lze AI reakci přirovnat k obraným rozpoznávacím mechanismům proti patogenům s tím rozdílem, že v tomto případě se organismus brání svému vlastnímu pylu (WRANA ET AL. 1994)

Na S-lokusu 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 *SCR* a *SRK*.

Některé geny ležící na S-lokusu jsou vysoce polymorfní, což je přirozené v případě genů, které se účastní rozpoznávací reakce. Znalost polymorfismů genů S-lokusu lze využít pro odlišení linií, vyhledávání AI rostlin z populace, ověření úspěšnosti křížení, zjištění čistoty a heterozygotnosti osiva, dále pro selekci po křížení, pro vytvoření vhodných linií, které se vzájemně spráší a nedojde však k opylení rostlin v rámci jedné linie.

Důležitá je zejména časná detekce inkompatibilních rostlin, k čemuž je třeba pouze malá část rostlinné tkáně. Nemusí se čekat na fenotypový projev autoinkompatibility resp.

autokompatibility. Například technika PCR-RFLP je užitečný nástroj pro předběžnou identifikaci S-haplotypu v rostlinném materiálu (NISHIO 1997).

Významné geny S-locusu:

SRK (S-locus receptor kinase; STEIN ET AL. 1991) gen kóduje transmembránový protein. Je exprimován v blizně a jeví se jako klíčový pro rozpoznávací reakci a AI odpověď.

SLG (S-locus glycoprotein; NASRALLAH ET AL. 1985) - gen pro S-locus glykoprotein. Jeho funkce není přesně známá, ale předpokládá se, že má pomocnou úlohu při průběhu AI reakce (TAKASAKI ET AL. 2000). Podílí se na pylové adhezi (LUU ET AL. 1999), hraje roli ve stabilizaci *SRK* a posiluje difúzi pylového faktoru do blizny (SCHOPFER ET AL. 1999). 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 (CHEN A NASRALLAH 1990). *SLG* geny třídy I pocházejí z dominantních haplotypů (OKAZAKI ET AL. 1999), pro jejich amplifikaci (PCR) je možno použít primery PS5 a PS15 (NISHIO ET AL. 1996). Po amplifikaci dostaneme fragment dlouhý přibližně 1 300 pb.

U většiny současných odrůd řepky došlo vlivem mutace ke ztrátě aktivity genu *SLG* třídy I. Naamplifikování *SLG* I znamená automaticky AK fenotyp (je dominantní a překryje účinek recesivních – aktivních i neaktivních alel). Alely *SLG* genu vykazují polymorfismus, lze je odlišit metodou RFLP, jsou v těsné vazbě s důležitými geny S-locusu podílejícími se na autoinkompatibilní reakci, což je předpokladem k využití tohoto genu jako markeru autoinkompatibility. Přestože gen *SLG* sám o sobě není k AI reakci bezpodmínečně nutný (TAKASAKI ET AL. 2000), splňuje velice dobře předpoklady genetického markeru pro autoinkompatibilitu (SOBOTKA 2001). Pro markerování autoinkompatibility se gen *SLG* ukázal být vhodný (SÁKOVÁ ET AL. 2002).

SCR (S-locus cysteine-rich 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). Také u genu *SCR*, jehož produkt je považován za samčí determinant, byla prokázána existence vysokého stupně polymorfismu (WATANABE ET AL. 2000).

Vzdálenost mezi geny *SLG* a *SRK* je různá v závislosti na S-haplotypu (CUI ET AL. 1999).

2.4. Rezistence řepky k *Phoma lingam*

Phoma lingam je jednou z nejdůležitějších chorob řepky způsobující poškození porostů ve všech světových oblastech pěstování. Z tohoto důvodu je šlechtění řepky pro zvýšenou rezistenci k fomové hnilobě jedním z nejdůležitějších úkolů šlechtitelského programu (PILET ET AL. 1999).

Původcem fomové hniloby (fomového černání stonků) je houba *Leptosphaeria maculans* (anamorfa *Phoma lingam*). U mladých rostlin se objevují na děložních listech, stonku, kořenovém krčku a na kořenech šedohnědé skvrny s tmavší obrubou. Silněji napadené rostliny hynou. U starších rostlin jsou tyto skvrny vpadlé. Při vlhkém a teplém počasí na podzim se mohou první typické symptomy objevit již velmi brzy. Na listech 14 dnů po infekci vznikají první nažloutlé (ve středu později bělavé) skvrny, v nichž se tvoří černé plodničky, tzv. pyknidy. Napadení listů však nemá vliv na výnos. Ačkoli přes zimu dochází k odumírání listů, pyknidy si zachovávají životaschopnost a představují zdroj infekce, který může rozhodovat o výši výnosu. Tento infekční potenciál bývá vyšší, jestliže listy zůstanou přes zimu součástí rostliny. Symptomy se objevují na jaře v podobě hnědočerných skvrn na bázi stonků. Skvrny se šíří, nemocné pletivo trouchniví, popř. korkovatí, narušuje se zásobení vodou a živinami a rostliny se mohou u kořenového krčku ohýbat. Skvrny na stoncích jsou charakteristické černým lemem, který ohraničuje zdravé pletivo od nemocného. Poškození stonku, která mohou být způsobena požerem škůdců (např. krytonoscem řepkovým nebo krytonoscem čtyřzubým) nebo růstovými trhlinami a trhlinami v důsledku teplotních změn, se stávají vstupní branou infekce pro tuto houbu. Při napadení kořenů kořenová kůra praská a odlupuje se ("černá noha"). Rostliny zaostávají v růstu a jdou snadno vytáhnout ze země (silně redukované "pahýlovité" kořeny). Dochází k napadení šešulí, z nichž patogen přerůstá do semen. Při časných podzimních infekcích může houba způsobovat vyzimování rostlin, při jarních předčasné dozrávání šešulí (KOUBOVÁ 2005).

Škody způsobené fomovou hnilobou se každý rok liší. Rozhodující roli přitom hraje náchylnost odrůd a průběh počasí. V letech s nízkým infekčním tlakem se však rozdíl mezi odrůdami příliš neprojevuje. Většina pěstovaných odrůd vykazuje relativně dobrou toleranci vůči této chorobě, takže aplikace fungicidů na podzim není zpravidla nutná. Pokud však nastanou podmínky, které podporují infekci (vlhký podzim, mírná vlhká zima), může se rozvinout napadení, které vyžaduje ochranný zásah (KOUBOVÁ 2005).

2.4.1. Podstata rezistence

Vlastní genetické založení odolnosti k fomové hnilobě není komplexně známo. Jedná se o široký rozsah typů dědičnosti - od monogenní k polygenní, od dominantní k recesivní. Tato variabilita dědičnosti v odolnosti k fomě se především odvíjí od typu a rasy patogena (CARGEEG A THURLING 1979, DELWICHE 1980, HILL 1991, PANG A HALLORAN 1996). V různých fenofázích řídí odolnost rozdílné geny (ZHU ET AL. 2003). Kvalitativní, úplná (specifická) rezistence se uplatňuje v časných stádiích, kvantitativní, částečná (nespecifická) rezistence u dospělých rostlin.





Kvalitativní (specifická) rezistence je založena na principu gen-proti-genu. Každému genu rezistence u hostitele odpovídá gen avirulence u patogena. Platí zde vztah gen virulence (patogen) - gen rezistence (hostitel). Odolnost či náchylnost závisí na přítomnosti jednoho major genu pro rezistenci v rostlině (R) a jednoho korespondujícího genu avirulence (AVR) u patogena (schéma 3). Toto specifické rozpoznání vede k rychlému spuštění defenzivní odpovědi rostliny na narušení listového povrchu a plně rostlinu před chorobou ochrání (ROUXEL ET AL. 2004). Přítomnost jednoho genu specifické rezistence znamená odolnost pouze vůči určité rase patogena. Šlechtění odrůd se specifickými geny rezistence je náročné a relativně málo rentabilní, protože tento typ rezistence bývá rychle (většinou během tří let) patogenem překonán zejména díky bodovým mutacím (ROUXEL ET AL. 2004).

Velmi významné rasově specifické geny rezistence jsou *Rlm1*, *Rlm2* a *Rlm4*. Ty jsou však zastoupeny spíše u ozimých odrůd řepky. Ve 26,6 % odrůd jarní řepky byl nalezen gen *Rlm4*, ovšem ostatní geny se vyskytují zřídka (ROUXEL ET AL. 2003). U odrůdy Darmor byl identifikován gen *Rlm9* (OLECHNOWICZ ET AL. 2004). Další gen rezistence *Rlm8* byl objeven u *B. rapa*. Tento gen je zodpovědný za rezistenci vůči australskému kmenu patogena. U dalšího druhu *B. juncea* jsou přítomny geny odolnosti *Rlm5* a *Rlm6* proti evropským kmenům *Phoma lingam* (BALESTEND ET AL. 2002). Tyto geny rezistence je možno introdukovat do odrůd *B. napus* (OLECHNOWICZ 2004). Gen *Rlm7* je poměrně nově objeveným genem rezistence k novozélandské rase patogena (BALESTEND ET AL. 2002). Podle zastoupení jednotlivých genů byly odrůdy rozděleny do 4 skupin a dalších podskupin (CETION, Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains 2004). Geny rezistence byly zmapovány do dvou oblastí (dvě vazbové skupiny) LG 10 (*Rlm 1,3,4,7,9*) a LG 16 (DELOURME ET AL. 2004).

Zároveň s výzkumy genů rezistence probíhá na molekulární úrovni studium genů virulence u patogena- lokalizace pomocí genů markerů, délka oblasti, sekvence, počty ORF,

vzdálenosti mezi různými geny virulence (cM). Zatím bylo objeveno 8 genů avirulence, 6 genů ve 2 klastrech po 3 genech (DELOURME ET AL. 2004).

Schéma 2.3.: Příklad interakce gen-proti-genu, vyjádřené na děložních lístcích řepky. Pouze kombinace genu rezistence *Rlm1* na straně rostliny a genu avirulence *AvrLm1* na straně patogena, nevede k příznakům choroby. (Převzato a upraveno podle Genoscope, Centre national de séquençage, 2004)

		genotyp rostliny	
		<i>Rlm1</i> rezistentní	<i>rlm1</i> náchylná
<i>AvrLm1</i> avirulentní	R		
<i>avrLm1</i> virulentní	N		

Kvantitativní (nespecifická) rezistence je polygeně založená a projevuje se u ní silná interakce genotypu s prostředím. Je zpravidla účinná proti širokému spektru patotypů parazita. Je trvalejší, avšak šlechtění je náročnější než u předešlé. Má spíše kvantitativní charakter. Vztah mezi těmito geny specifické rezistence a jejich potencionální role v rezistenci dospělých polních rostlin je diskutovatelná. Dva regiony, nesoucí *Rlm*, nekorrespondují s majoritním QTL pro kvantitativní rezistenci (DELOURME ET AL. 2004).

2.4.2. Molekulární markery rezistence

Snahou šlechtitelů je získat rezistentní nebo alespoň vysoce tolerantní odrůdy. Nalezení vhodného molekulárního markeru by urychlilo a zefektivnilo šlechtění k rezistenci. Pomocí markeru je možné odhalit náchylné (např. po křížení dvou různých odrůd) a odolné jedince již v časně fázi ontogeneze a pro další práci použít jen vhodné rostliny. Odpadá tím, nebo je alespoň omezena, nutnost laboratorních a polních testů rezistence k dané chorobě. Obtížnost nalezení molekulárního markeru vyplývá ze složitosti podstaty rezistence. Kvantitativně založená rezistence je mapována pomocí *quantitative trait loci* (QTL).

U kvalitativní rezistence je možné nalezení markeru segregujícího s nějakým genem rezistence, ale složitost je ve velkém množství genů, z nich každý zabezpečuje rezistenci jen proti jedné z mnoha ras patogena (FERREIRA ET AL. 1995).

U dihaploidních linií získaných po křížení odrůd Major a Stellar bylo pomocí molekulárních markerů identifikováno asi 7 regionů, které by mohly být asociovány s geny rezistence. Významný lokus zodpovědný za rezistenci k fomové hnilobě v časném vývojovém stadiu řepky se zdá být *LEM 1* (FERREIRA ET AL. 1995). U kříženců odrůd Westar a Crésor byl nalezen QTL označený jako *LmFr1*. Tato rezistence se projevovala ve čtyřech rozdílných podmínkách prostředí (DION ET AL. 1995). Dalším lokusem asociovaným s rezistencí k *L. maculans* je *LmR1* nalezený u odrůdy Shiralee (MAYERHOFER ET AL. 1997).

PILET ET AL. (1999) se pokusili vytvořit genetickou mapu pomocí 288 markerů (RAPD a RFLP). Materiálem byly DH populace, kde donorem rezistence byla odrůda Darmor pocházející z odrůdy Jet Neuf. Tato odrůda vykazuje nespecifickou polygenní rezistenci. Byly nalezeny dva QTL - DY2 a DY3 s významnými aditivními účinky. Zdá se však, že jeden z QTL je ovlivněn prostředím (vliv ročníku). U jiného křížení byly zjištěny tři významné QTL, z nichž dvě mají dominantní a superdominantní účinky na rezistenci.

Ze současného sortimentu registrovaných odrůd řepky v ČR byly vyhodnoceny na základě statisticky významných rozdílů v laboratorních testech jako odolné dvě odrůdy Capitol a Jesper. Naopak náchylné jsou odrůdy Mohican a Orkan (PLAKCHÁ ET AL. 2002). Zahraniční autoři uvádějí podobné údaje o odrůdě Capitol. U odrůdy Capitol byl potvrzen zmiňovaný gen rezistence *Rlm1* (BALESTEND ET AL. 2002).

3. CÍLE PRÁCE

Byly vetyčeny dva základní cíle práce. Prvním je **analýza genů *SLG*** a stanovení možností jejich využití jako molekulárních markerů autoinkompatibility u řepky. Druhým cílem je hledání molekulárního **markeru odolnosti řepky k houbové chorobě *Phoma lingam***.

Analýza genů *SLG* a jejich využití jako molekulárních markerů

Dílčí cíle:

1. charakteristika genů *SLG* u odrůd a linií řepky, porovnání sekvencí a stanovení možnosti využití nalezeného polymorfismu při práci ve šlechtění,
2. zjištění korelace mezi fenotypovým projevem AI a molekulárními daty, což je důležitý aspekt pro praktické využití genu jako markeru určitého znaku,
3. testování molekulární metody (PCR-RFLP) za účelem rychlého a jednoduchého odhalení genetické odlišnosti materiálu potenciálně použitelného v hybridním šlechtění řepky.

Odvození molekulárního markeru odolnosti řepky k houbové chorobě *Phoma lingam*

Genetický marker by měl pomoci odlišit náchylné a odolné jedince rostlin řepky k fomové hnilobě. Snahou šlechtitelů je získat rezistentní nebo alespoň vysoce tolerantní odrůdy. Nalezení vhodného molekulárního markeru by urychlilo a zefektivnilo šlechtění k rezistenci. Pomocí markeru je možné odhalit náchylné (např. po křížení dvou různých odrůd) a odolné jedince již v časně fázi ontogeneze a pro další práci použít jen vhodné rostliny. Odpadá tím, nebo je alespoň omezena, nutnost laboratorních a polních testů rezistence k dané chorobě.

Dílčí cíle:

1. vyhledání RAPD markeru, který odlišuje náchylné (Mohican a Orkan) a odolné (Capitol a Jesper) odrůdy,
2. ověření segregace markeru v F2 generaci (resp. R1 generaci) štěpící populace kříženců náchylné a odolné odrůdy, stanovení korelace markeru s fenotypem (odolností), statistické hodnocení,
3. rozpracování metodiky navržení specifického markeru pro odolnost k fomové hnilobě.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Charakteristika rostlinného materiálu

K analýzám *SLG* genů bylo použito spektrum 24 odrůd: Odila, Rasmus, Zorro, Navajo, Lirajet, Mohikan, Laser, Capitol, Pilot, Ramiro, Cando, Catonic, Orkan, Jesper, Global, Topas, Regent, Ceres, Falcon, Sonata, Arabela, Slapská Stela, Solida a Westar. Osivo pocházelo z genové banky VÚRV Praha Ruzyně a VÚOL Opava. Dále byly použity AI linie Tandem, Start a WRG. AI linie pocházely z cíleného vyhledávání AI rostlin, které probíhalo na pracovišti VÚOL v Opavě. Vyznačují se vysokou stabilitou AI recesivního typu (HAVEL 1996). Dalším materiálem pocházejícím z VÚRV Ruzyně byly dihaploidní linie (F2 štěpící generace, celkem 118 rostlin) po křížení AI linií odvozených z odrůdy Tandem s různými AK donory kvality (OP-BN-03, Lisek, Rasmus). Pro stanovení hybridnosti byly použity kříženci linií Start a WRG. Jednalo se o populaci dvaceti pěti rostlin pocházejících z VÚRV Praha Ruzyně.

Pro hledání markeru rezistence k *Phoma lingam* byly použity dvě odrůdy vyhodnocené v testech jako náchylné - Mohican a Orkan, dále pak dvě odrůdy vyhodnocené jako odolné Capitol a Jesper. Osivo pocházelo z VÚRV Praha Ruzyně. Dalším materiálem byly F2 štěpící (R1) populace kříženců (100 jedinců) vždy jedné náchylné odrůdy s odolnou. Tyto jedinci vznikly pylovou embryogenezí regenerací z kultur mikrospor (100 % homozygotnost - 50 % homozygotů dominantních a 50 % recesivních). Materiál pocházel z VÚRV Praha Ruzyně.

DNA byla izolovaná podle potřeby analýzy - ze směsného vzorku rostlin sledované odrůdy nebo z jednotlivých rostlin. K izolaci byly použity listy, a to v různém vývojovém stadiu rostlin.

4.2. Semenný test

Pro srovnání molekulárních dat *SLG* genu s fenotypem byl použit tzv. semenný test. Test probíhal ve skleníku ZF JU. Rostliny se 2-3 listy byly po dobu 6 týdnů podrobeny jarovizaci v klimatizovaných boxech na VÚRV Praha Ruzyně. Po jarovizaci byly rostliny přesazeny do květináčů a umístěny ve skleníku. Květenství byla zaizolována textilními izolátory, aby nedošlo k nekontrolovanému sprášení (obr. 4.1.), resp. cizosprášení. Po odkvětu a sklizni šešulí se hodnotil počet semen. K získání semen u rostlin, které pod izolátory

nenasazovaly semena se použila (pro překonání AI) metoda opylením v poupěti (obr. 4.2). Po opylení v poupěti byla květenství ihned znovu zaizolována.

Obr. 4.1.: Semenný test



Obr. 4.2.: Překonání AI opylením v poupěti



4.3. Laboratorní test hodnocení odolnosti

Při hledání markeru odolnosti k *P. lingam* byla použita data z laboratorního testu odolnosti (tzv. inokulační test). Rostliny mikrosporových regenerantů z F1 kříženců donorových rostlin byly inokulovány v rozdílných vývojových fázích. Infekce byla provedena, bylo-li to možné, na nejvyšší palisty, pokud rostliny neměly vytvořený stonek s palisty, byly infikovány pravé listy. Na jednu rostlinu bylo provedeno šest vpichů inokula, každý vpich byl vyhodnocen separátně. Hodnocení bylo provedeno 14 dnů po inokulaci. Tento test probíhal na pracovišti VÚOL Opava.

4.4. Extrakce DNA

Genomická DNA byla izolována pomocí kytu Invisorb, Spin Plant Mini Kit. K izolaci bylo použito cca 100 mg rostlinného pletiva rozdrčeného v tekutém dusíku. Většinou byla část roztoku DNA zamrazena při cca - 70 °C a archivována.

Izolace DNA fragmentů z gelu byla prováděna tak, že se požadovaný fragment vyříznul z gelu skalpelem pod transiluminátorem a dále byl přečištěn pomocí kytu Jet quick Gel Extraction Spin Kit, Genomed.

Plazmidová DNA byla izolována kitem Invisorb, Plasmid Mini Kit

Izolace genomové DNA (Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitek)

1. 60 mg rostlinného materiálu homogenizovat v tekutém dusíku
2. přidat 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy K, vortexovat a 30minut inkubovat při 65°C
3. převést lyzační roztok na kolonku, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm
4. k filtrátu přidat 200 µl vázacího pufru a důkladně vortexovat
5. přenést suspenzi na kolonku a inkubovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
6. přidat 550 µl promývacího pufru I a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
7. přidat 550 µl 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 navázanou DNA dát do nových 1,5ml ependorfek, přidat 100 μ l elučního pufru D, který je předeřtý na 65°C, 3 min. inkubovat, centrifugovat 2 min. při 12000 rpm

Eluce fragmentů DNA z agarózového gelu (JETQUICK)

1. z agarózového gelu vyříznout bloček s požadovaným fragmentem DNA
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 do kolonek, 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 ependorfek, přidat 50 μ l sterilní vody, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm

Izolace plazmidové DNA (Invisorb Spin Plastid Mini Kit – Invitek)

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

4.5. DNA analýzy

PCR

PCR s následnou separací produktů na 1,5 % agarozových gelech byla použita pro analýzy *SLG* genů tříd I a II.

PCR reakce se skládala z:

- 1,5 μ l roztoku genomické DNA (cca 75 ng)
- 0,25 μ l každého z primeru (0,0125 nmol)
- 2,5 μ l 10 x reakčního pufru TaKaRa
- 2 μ l dNTPs TaKaRa
- 0,2 μ l (1 U) termostabilní Taq polymerázy TaKaRa

Reakce byla doplněna 18,3 μ l millipore H₂O do finálního objemu 25 μ l. Pro PCR *SLG* geny třídy I byly použity primery (tabulka 4.1.) PS5 a PS15 (NISHIO ET AL. 1996), pro *SLG* II primery (tabulka 4.1.) PS3 a PS21 (NISHIO ET AL. 1996).

PCR probíhala v termocyklerech za podmínek:

- denaturace 93 °C 1 minuta
- annealing 58°C 2 minuty
- elongace 72°C 3 minuty,
- 35 cyklů

Dále následoval krok s teplotou 4 °C, který trval do vyndání vzorků z cyklieru. PCR produkty byly rozděleny na 1,5 % agarózovém gelu (1,5 g agarózy + 100 ml 1 x TBE pufru) a vizualizovány ethidium bromidem (cca 2 μ l roztoku ethidium bromidu o koncentraci 0,2 μ g/ml na 100 ml gelu). Pro orientační stanovení velikostí PCR produktů byl používán 100 bp λ marker. Elektroforéza probíhala při napětí 30 V po dobu 30 min a dále 80 V po dobu 2,5 – 3 hodiny.

PCR z plazmidové DNA probíhala za stejných podmínek jako PCR, kde byla templátem rostlinná genomická DNA.

Primery byly syntetizovány v Laboratoři molekulární fyziologie rostlin MU, Brno.

Tab. 4.1.: Primery použité pro PCR genů *SLG* (NISHIO ET. AL. 1996)

primery:	sekvence (5'→3'):
PS 5 (pro SLG třídy I)	ATG AAA GGC GTA AGA AAA ACC TA
PS 15 (pro SLG třídy I)	CCG TGT TTT ATT TTA AGA GAA AGA GCT
PS 3 (pro SLG třídy II)	ATG AAA GGG GTA CAG AAC AT
PS 21 (pro SLG třídy II)	CTC AAG TCC CAC TGC TGC GG

PCR-RFLP

PCR produkty byly podrobeny restričnímu štěpení. Pro štěpení byly použity endonukleázy *Mbo* I, *Eco* RI, *Msp* I a *Afa* I. Štěpná reakce byla míchána podle návodu výrobce enzymu.

Obecně se reakce skládala z:

PCR reakce (25μl)

enzymu (cca 20 U)

10 % pufru příslušného k danému enzymu

případně 10 % BSA (je-li to nutné)

Koncentrace enzymu a DNA byla někdy mírně upravována. Štěpení probíhalo cca 4 hodiny při 37 °C. Po štěpení následovala separace fragmentů (obdobně jako u PCR) na 2 % agarózovém gelu, vizualizace ethidium bromidem a hodnocení spekter.

RAPD

Jedná se o PCR s nespecifickými primery, tzv. RAPD (WILLIAMS ET AL. 1990). Použity byly primery z primerových sad řady Operon.

PCR reakce probíhala obdobně jako u specifické PCR. Bylo použito cca 10 pM primeru (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA).

45 PCR cyklů proběhlo v thermocycleru za následujících podmínek:

1 min denaturace 92°C

2 min annealing 35°C (zásadní rozdíl)

3 min elongace při 72°C

Produkty byly separovány v 1,5% agarózovém gelu a detekovány ethidium bromidem.

Výsledná spektra pruhů byla porovnána a pro další práci vybrány pouze primery, které odlišovaly skupiny rostlinného materiálu. U těchto vybraných primerů bylo nutné reakce

opakovat, a to minimálně dvakrát, protože právě opakovatelnost někdy bývá u RAPD sporná (PENNER ET AL. 1993).

Klonování

Požadované produkty byly z gelu vyříznuty skalpelem pod transiluminátorem a přečištěny pomocí kitu Jet quick, Gel Extraction Spin Kit, Genomed. Vyizolovaný pruh byl zaklonován do plazmidového vektoru pCR4-TOPO (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing) a následně byly vektorem transformovány bakterie *E. coli* (TOP 10). Po selekci transformantů byly jednotlivé klony napěstovány a plazmid s inzertem vyizolován kitem Invisorb, Plasmid Mini Kit. Úspěšnost klonování byla prokázána vyštěpením inzertu z vektoru restriktázou *EcoRI* a následnou elektroforézou.

Klonování (Topo TA Cloning Kit for Sequencing – 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 skladování 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 media, promíchat, nenasávat
7. 1 hod. třepat při 37° C v hnízdě
8. mezitím rozetřít na misky s LB mediem 40 μ l Xgal (sterilní hokejkou) a dát na misky a 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 media + 12 μ l AMP
2. kultivovat 16 hod. při 37° C přes noc

3. den

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

Sekvenování

Příprava pro sekvenování probíhala ve dvou PCR sekvenačních reakcích se značenými nukleotidy za použití primerů forward (T7) a reverse (M13). Samotné sekvenování bylo provedeno v Laboratoři molekulární fyziologie rostlin PřF MU v Brně a genetickém analyzátoru ABI PRISM 310, EntÚ AVČR České Budějovice (forma služby).

Pro vyhodnocování, kompletování a porovnávání sekvencí byl použit program BioEdit. Za pomoci tohoto programu byla zároveň stanovena restriční místa pro jednotlivé endonukleázy.

Sekvenační reakce (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start

Kit – Beckman Coulter)

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

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, složení na jednu reakci: 2 µl 100 mM EDTA, 2 µl 3M octanu sodného (pH 5,2), 1 µl glykogenu
2. přidat 60 µl 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

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Analýza genů *SLG* a jejich využití jako molekulárních markerů

SLG patří mezi tři známé vysoce polymorfní geny S-locusu. Spolu s *SRK* se exprimuje v bliznách.

SLG geny třídy I pocházejí z dominantních haplotypů (OKAZAKI ET AL.1999), pro jejich amplifikaci (PCR) se používají primery PS5 a PS15 (NISHIO ET AL. 1996). Očekávaný produkt by měl mít velikost cca 1 330 pb (SOBOTKA 2001).

SLG geny třídy II pocházejí z recesivních haplotypů (OKAZAKI ET AL.1999), pro jejich amplifikaci (PCR) se používají primery PS3 a PS21 (NISHIO ET AL. 1996). Výsledkem amplifikace by měl být produkt dlouhý asi 1 100 pb (SOBOTKA 2001).

5.1.1. *SLG* I jako selekční marker autoinkompatibility

Analýzy byly provedeny u dihaploidních linií vzniklých z F₁ kříženců AI linií a donora 00 kvality. Do pokusu bylo zařazeno 118 rostlin.

Dihaploidní rostliny pocházely z těchto křížení:

AIK-6 x OP-BN-03

AIK-6 x Lisek

AIK-3 x Rasmus

AIK-6, AIK-3 – AI linie odvozené z Tandemu

OP-BN-03, Lisek, Rasmus – donoři kvality

DNA byla izolována individuálně z děložních lístků každé rostliny. Dále následovala PCR se specifickými primery pro amplifikaci genu *SLG* I. Předpokladem bylo, že u AK rostlin se amplifikuje gen *SLG* třídy I a u AI rostlin ne.

U 57 rostlin byl přítomen produkt amplifikace dlouhý cca 1 330 pb a u 61 rostlin nikoli (obr 5.1.). Zároveň byl u všech rostlin přítomen produkt cca 1 000 bp dlouhý, pravděpodobně se jedná o nespecifický fragment. Segregace molekulárního markeru byla 57 : 61 (AK : AI), což odpovídá očekávanému štěpnému poměru 1:1 na hladině významnosti 5 % (vypočtená hodnota χ^2 je 0,1356; kritická hodnota χ^2 na 5 % hladině významnosti pro 1 stupeň volnosti je 3,84).

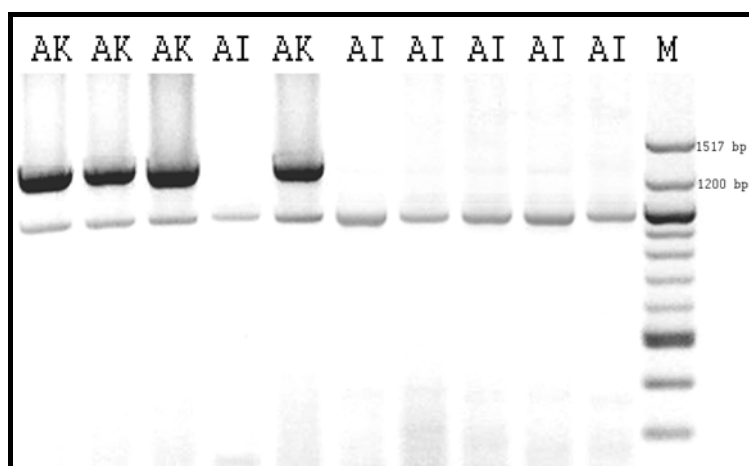
Podle *SLG I* markeru byly vybrány potenciální AI rostliny. Úroveň AI reakce zkoumaného materiálu byla ověřována fenotypovou analýzou tzv. semenným testem. Semenný test by měl ukázat spolehlivost molekulární analýzy a účinek modifikačních vlivů, které by během ontogeneze u rostlin mohly ovlivnit sílu autoinkompatibility. U plně autoinkompatibilních rostlin se pohyboval počet semen na šesuli v průměru od 1 do 4,6. Některé rostliny však nasazovaly semen o něco více (v průměru od 5,1 do 6,8), jednalo se o rostliny částečně autoinkompatibilní.

U AI rostlin bylo zároveň se semenným testem ověřováno opylení v poupěti pro překonání AI. Bylo potvrzeno, že opylením v poupěti lze obejít AI a získat semena pro další pokusy.

U 61 rostlin se neamplifikoval gen *SLG I*, ty byly označeny jako potenciálně autoinkompatibilní. Skutečně autoinkompatibilních (a částečně AI) bylo 56 rostlin. Molekulární marker segregoval v poměru 57 : 61 (AK : AI). Fenotypový štěpný poměr AK : AI byl 62 : 56, což by stále odpovídalo teoretickému štěpnému poměru 1:1 (na hladině významnosti 5%; χ^2 je 0,3051). Semenné testy tedy ukázaly ve sledované populaci shodu genetických analýz se skutečným projevem AI 91,8 %, ovšem pouze za předpokladu, pokud do AI rostlin zahrneme i tak zvané částečně autoinkompatibilní. Pomocí *SLG* nelze stoprocentně selektovat AI rostliny, ale lze významně snížit procento AK rostlin v populaci.

Pokud zahrneme rostliny částečně AI do AK, odpovídá fenotyp spíše štěpnému poměru 1:3, což by mohlo být vysvětleno existencí tzv. R-lokusu (ŽALUDOVÁ 2007).

Obr. 5.1.: Amplifikace genu *SLG I*



AK - autokompatibilní fenotyp, AI – autoinkompatibilní fenotyp, M – 100 bp ladder

Ačkoliv gen *SLG* nehraje v AI reakci důležitou roli, lze ho s úspěchem využít jako selekčního markeru autoinkompatibility (OKAZAKI ET AL. 1999, SUZUKI ET AL. 2000). Data molekulárních analýz *SLG* genu byla porovnána s analýzami genu *SCR* (ŽALUDOVÁ 2007), který pravděpodobně kóduje samčí determinant a hraje tak oproti *SLG* genu nezbytnou roli při rozpoznávání pylu na blizně (SCHOPFER ET AL. 1999, SUZUKI ET AL. 1999). Žaludová dospěla k závěru, že analýzy *SLG* a *SCR* se shodují.

SLG gen vykazuje velkou sekvenční homologii s tzv. *S*-locus related genes (*SLR1* a *SLR2*), které nejsou ve vztahu s *S*-lokusem (WATANABE ET AL., 1992), proto lze usuzovat, že by nemusel být tím nejlepším markerem *S*-haplotypů. Ovšem na analyzované populaci dihaploidních rostlin po křížení AI a AK rodičů funguje selekce pomocí *SLG I* genu jako markeru autoinkompatibility velice dobře. Pro křížení použité AI linie mají autoinkompatibilitu recesivního typu, *SLG I* dominantní se neamplifikuje. Druhá komponenta pro křížení byly různé AK odrůdy a donoři kvality, kde se *SLG I* amplifikuje, ovšem je nefunkční, proto jsou rostliny AK (tato problematika je ještě popsána níže). Po křížení homozygotních rodičů s následnou dihaploidizací získáme potomstvo, kde polovina rostlin má dominantní *SLG I* gen, ty by měly být AK bez ohledu na další recesivní alely. U druhé poloviny potomstva je absence dominantního *SLG I* genu, mohou se projevit recesivní alely, tudíž jsou rostliny AI.

Aby gen *SLG I* mohl být použitý jako selekční marker, musí být pro selektované populace splněny tři podmínky:

1. Autoinkompatibilita u AI materiálu musí být recesivního typu.
2. Všechny dominantní alely musí být nefunkční.
3. Pro křížení musí být AK komponenta dominantní heterozygot a AI komponenta recesivní homozygot. Pokud by byla AK komponenta dominantní homozygot (spíše teoretická úvaha), bude všechno potomstvo AK, ale stále zde funguje model selekce pomocí *SLG I*. Pokud by ale AI komponenta byla recesivní heterozygot s jednou alelou recesivní aktivní a druhou recesivní neaktivní, dostaneme potomstvo po křížení s AK dominantním heterozygotem (s jednou alelou dominantní neaktivní a druhou alelou recesivní neaktivní) v poměru fenotypově 1:3 a genotypově 1:1:1:1, přičemž 25 % potomstva získá od obou rodičů neaktivní recesivní alelu, fenotypově bude toto potomstvo AK, ačkoliv se u něj nebude amplifikovat *SLG I* dominantní alela.

Situace je do značné míry komplikována existencí ještě dalších alel z druhého genomu.

Fenotypová analýza odhalila tzv. částečnou autoinkompatibilitu u některých rostlin. Tu lze vysvětlit existencí dalšího lokusu tzv R-lokusu (repressor locus), který je běžně přítomen u AK odrůd řepky a není přítomen u AI linií, respektive u AI linií je přítomna ne supresorová alela (EKUERE ET AL. 2004). Oba lokusy (S i R) mohou ovlivňovat AI reakci. Lze předpokládat, že právě u rostlin s částečnou autoinkompatibilitou jsou přítomny oba lokusy (S i R) s funkčními alelami, které spolu vzájemně interagují. Modifikační geny způsobují pouze oslabení AI reakce bez detekovatelných změn exprese genů na S-lokusu. O významu genů, které neleží na S-lokusu, svědčí studie, podle níž vykazuje účinnost AI reakce významnou variabilitu mezi různými AI liniemi se shodným S-haplotypem (RUFFIO-CHABLE 1998).

Podle některých autorů je důležité se zaměřit také na ostatní geny S-lokusu využitelné pro identifikaci S-haplotypů, a to PCR-CAPS *SRK* genu (PARK ET AL., 2002) a *SCR* genu zejména pro svůj více polymorfni charakter (ŽALUDOVÁ 2007).

5.1.2. Analýza alel genu *SLG I*

Sobotka (2001) prokázal u sledovaného AK materiálu řepky (některé odrůdy a donory kvality) dominantní alelu *A10* (délka 1336 pb) *SLG* genu třídy I z genomu C (SOBOTKA 2001). Usuzoval tak podle velikosti restričních fragmentů po štěpení PCR produktu restriktázou *Mbo I*. Amplifikace *A10* alely znamená AK fenotyp, protože *A10* alela je dominantní (potlačí všechny ostatní alely), ale nefunkční, z důvodu delece jedné báze v genu *SRK*, která vede k předčasnému ukončení translace a produkci zkráceného *SRK* proteinu (GORING ET AL. 1993). To také vysvětluje, proč je většina současných odrůd řepky AK. Dále Sobotka prokázal, že u analyzovaného materiálu se žádná jiná *SLG I* alela neamplifikuje. Otázkou bylo, zda je tomu tak skutečně u širšího spektra odrůd.

Bylo provedeno PCR-RFLP *SLG I* u širokého sortimentu odrůd (24). Pro důkaz přítomnosti alely *A10* bylo použito PCR-RFLP genu *SLG I*. Alela *A10* genu *SLG I* má pro enzym *Mbo I* čtyři štěpná místa, štěpí se na fragmenty o velikosti 429, 330, 269, 242 a 66 pb (SOBOTKA 2001).

Osivo pro analýzy pocházelo z genové banky. DNA byla izolována z děložních lístků vždy několika rostlin jedné odrůdy. Ve většině případů (Rasmus, Zorro, Navajo, Lirajet, Mohikan, Laser, Capitol, Pilot, Ramiro, Cando, Catonic, Orkan, Jesper, Regent, Ceres,

Falcon, Sonata, Arabela, Slapská Stela, Solida a Westar) se spektra po štěpení shodovala se spektrem zmiňované alely *A10* (obr 5.2.).

Pouze odrůdy Global, Topas a Odila vykazovaly po štěpení genu *SLG I* restriktázou *Mbo I* jiné spektrum pruhů. Jde tedy pravděpodobně o jinou alelu než *A10*.

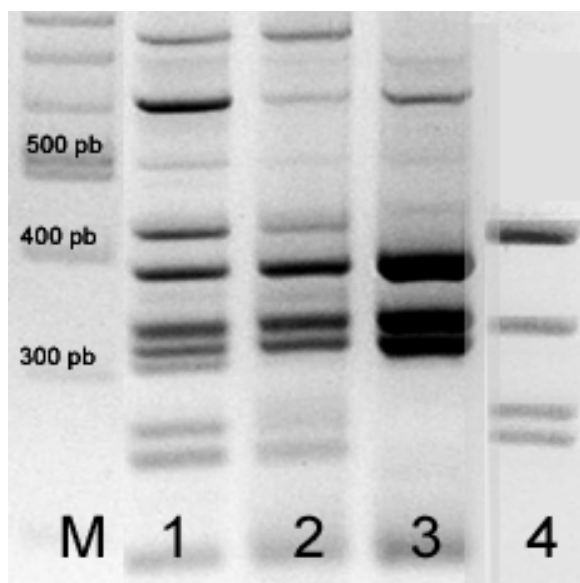
Obr. 5.2.: PCR-RFLP genu *SLG I* (*Mbo I*)



Vzorky: 11-Odila, 12-Rasmus, 13-Zorro, 14-Navajo

Velikost genu *SLG I* je přibližně 1330 pb (*A10*-1336 pb). Sečteme-li velikosti fragmentů u odrůd s odlišnou alelou, dostaneme číslo minimálně dvakrát větší než je 1 330. Z toho lze usuzovat, že v odrůdách je přítomno více alel (obr. 5.3.), respektive v odrůdách jsou přítomny rostliny s různými alelami.

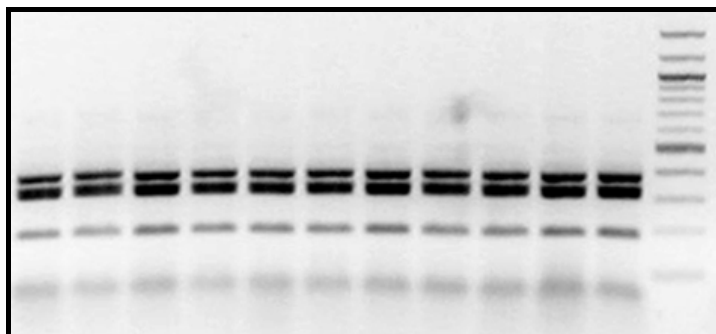
Obr. 5.3.: PCR-RFLP genu *SLG I* (*Mbo I*) u odrůd, které vykazovaly jiné spektrum pruhů než je spektrum pro alelu *A10*. + přiřazeno PCR-RFLP spektrum *SLG I* genu u odrůdy Westar, kde byla potvrzena alela *A10* (GORING ET AL. 1993)



M marker, 1 Odila, 2 Global, 3 Topas, 4 Westar *A10* (foto z jiného gelu) - 429, 330, 269, 242, 66 pb

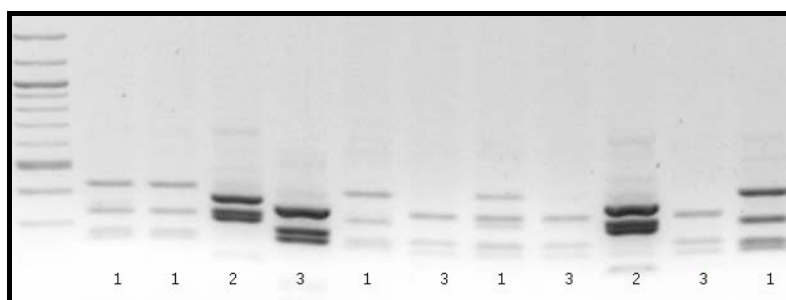
Jednalo se o směsné vzorky, proto bylo dále přistoupeno k analyzování jednotlivých rostlin. U všech tří analyzovaných odrůd byla situace odlišná. Použito bylo vždy 11 rostlin od každé odrůdy. U odrůdy Odila se nepodařilo v žádné rostlině prokázat jinou alelu než je alela *A 10*. U odrůdy Topas ukazovala spektra pruhů u všech rostlin jinou alelu než je alela *A 10* – obr. 5.4., ale u všech vzorků stejnou (podle *Mbo I*).

Obr. 5.4.: PCR-RFLP (*Mbo I*) genu *SLG I* u rostlin odrůdy Topas



U odrůdy Global byla situace složitější. Mezi jedenácti rostlinami byly nalezeny tři různá spektra PCR-RFLP genu *SLG I* po štěpení *Mbo I*. Jedno spektrum pruhů odpovídá alele *A10* (označené jako 1). Dalším typem bylo stejné spektrum pruhů jako u odrůdy Topas (označené jako 2). Třetí spektrum bylo odlišné (označené jako 3) od alely *A10* i alely z Topasu (obr.5.4.).

Obr. 5.4.: PCR-RFLP (*Mbo I*) genu *SLG I* u rostlin odrůdy Global



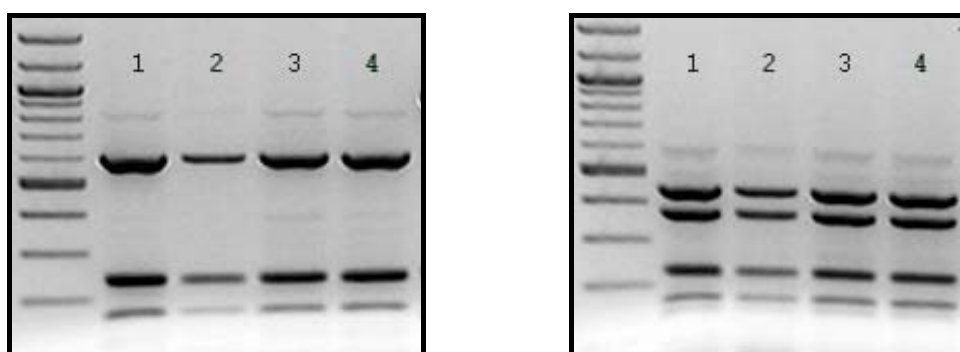
- 1- rostliny se spektrem pruhů odpovídající alele *A10*
- 2- rostliny se spektrem pruhů stejným jako u odrůdy Topas
- 3- rostliny se spektrem pruhů odlišným od *A10* alely i alely s Topasu

Dále následovalo klonování do vektoru. Pro klonování byly vybrány 2 rostliny z odrůdy Global, každá s jinou alelou (jedna z rostlin označených na obr. 5.4. jako „2“ -

rostliny se spektrem jako u odrůdy Topas a jedna rostlina z označených jako „3“ - rostliny s spektrem odlišným od *A 10* i alely z Topasu).

Alela z odrůdy Topas nebyla klonována, protože se jedná pravděpodobně o stejnou alelu jako u odrůdy Global (alela označená „2“ v obr.5.4.). Zda se u Topasu skutečně jedná o stejnou alelu jako u Globalu muselo být ještě prokázáno štěpením dalšími enzymy (*Afa* I a *Msp* I). Jak ukazují spektra pruhů po štěpení dalšími enzymy na obr. 5.5., byla tato hypotéza potvrzena.

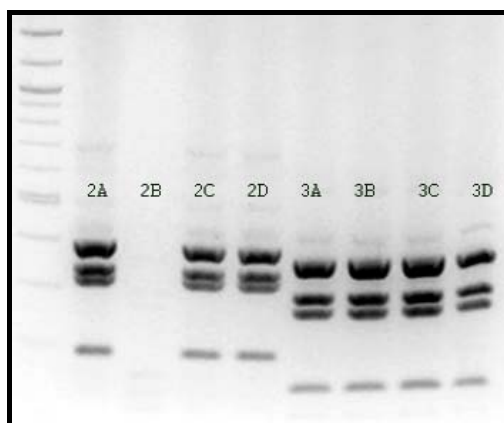
Obr. 5.5: Srovnání PCR-RFLP spekter genu *SLG* I rostlin odrůd Topas a Global (alela „2“), u kterých se předpokládá shodná alela, vlevo - *Msp* I, vpravo - *Afa* I



1 a 2 Topas
3 a 4 Global (rostliny z obr. 5.4. označené jako „2“)

Pro sekvenování byly vybrány 4 klony od každé rostliny. Úspěšnost klonování byla stanovena na základě reamplifikace *SLG* I genu z vektoru. Zároveň byly produkty reamplifikace podrobeny štěpení restriktázou *Mbo* I pro důkaz, že se podařilo zaklonovat patřičné alely (obr.5.6.). Kromě vzorku 2B byla ve všech ostatních případech zaklonovaná příslušná alela.

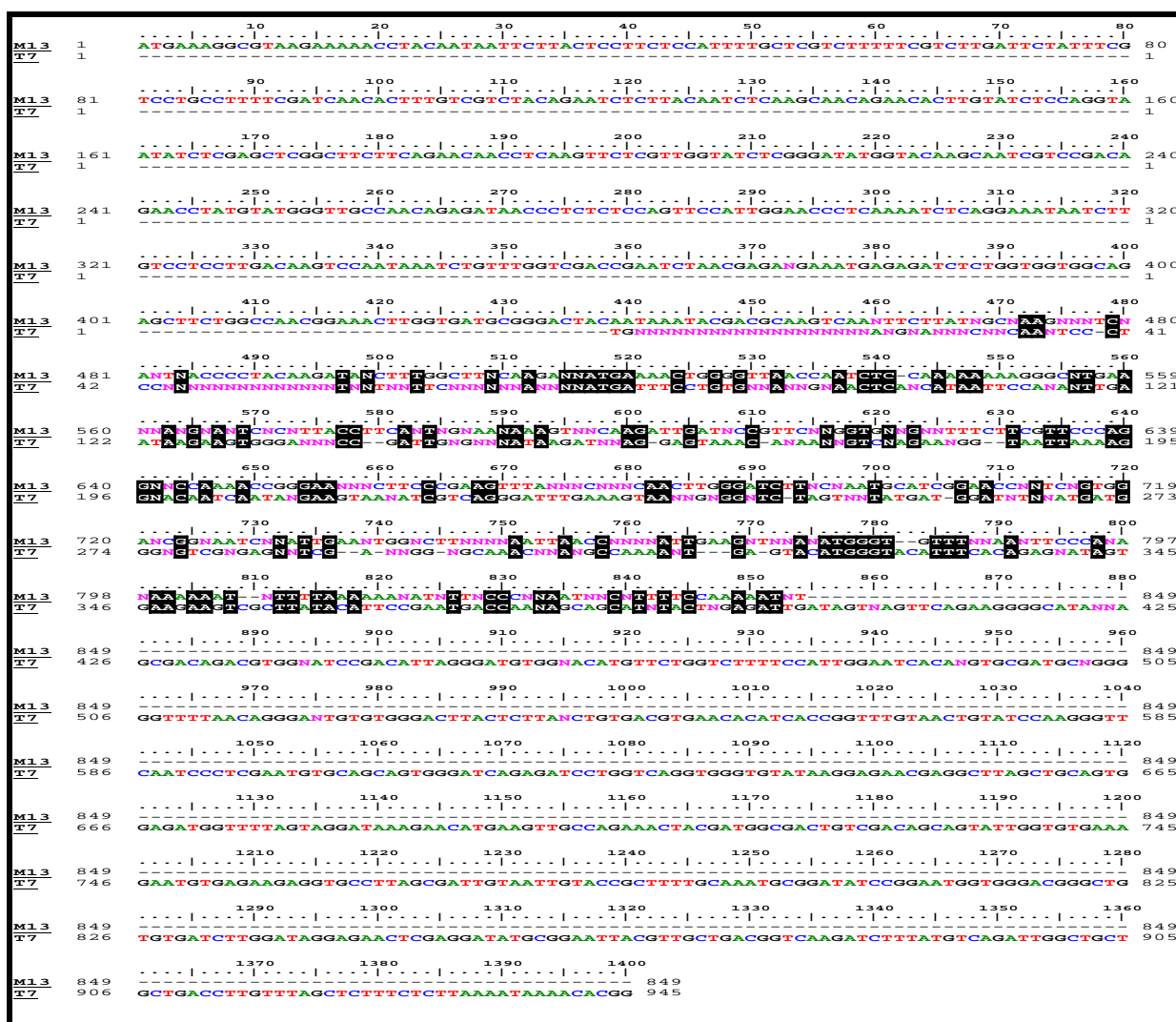
Obr.5.6.: Kontrola úspěšnosti klonování reamplifikací z vektoru a následným štěpením *Mbo* I



2A-2D klony s *SLG* z rostliny označené jako „2“ na obr.13
3A-3D klony s *SLG* z rostliny označené jako „3“ na obr.13

Všechny klony byly sekvenovány. Z každé strany produktu bylo přečteno cca 500-600 bází, což ovšem nestačí k úplnému zkompletování celé sekvence, jelikož se jedná o úseky dlouhé cca 1300 pb. Z demonstrace jedné sekvence (obr.5.7.) je patrné, že na překrývajících se koncích je velké množství nepřechtených bází. Řešením by bylo podle získaných sekvencí navrhnout vnitřní primery, za jejichž pomocí bude amplifikován zkrácený úsek *SLG* genu, který bude dále sekvenován.

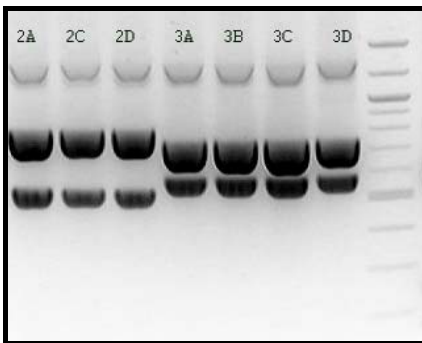
Obr. 5.7.: Sekvenování *SLG* genu třídy I z odrůdy Global



Protože se nepodařilo osekvenovat alely, byla provedena PCR-RFLP analýza získaných klonů. Výsledek je velmi překvapující a zdá se, že situace ohledně alel genu *SLG I* v odrůdě Global je o mnoho složitější. Spektra na obrázcích 5.8., 5.9. a 5.10. ukazují, že v jedné rostlině je dokonce více typů alel. Teoreticky je to možné, protože řepka je alotetraploid. Může mít tedy v genomu až čtyři různé alely jednoho genu. Podrobné výsledky však ukáže až sekvenování. Rozhodně by bylo zajímavé zjistit detaily o těchto alelách, např. funkčnost, vztah mezi nimi, případně mutace. Dále by bylo vhodné zjistit fenotyp rostlin, zejména zda jsou všechny rostliny AK.

PCR-RFLP *EcoRI* rozlišuje pouze dva typy získaných klonů (resp. dva typy alel), tak jako *MboI*-v každé rostlině 1 alela (obr. 5.8.)

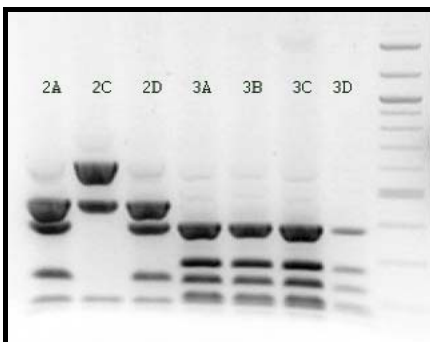
Obr. 5.8.: PCR-RFLP z vektoru (*Eco RI*)



2A-2D klony s *SLG* z rostliny označené jako „2“ na obr.5.4.
3A-3D klony s *SLG* z rostliny označené jako „3“ na obr.5.4.

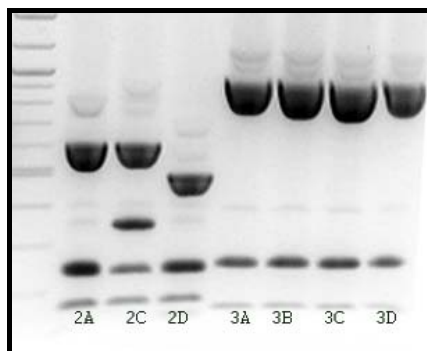
PCR-RFLP pomocí enzymu *Afa I* (obr. 5.9.) ovšem odhaluje to, že z rostliny 2 se podařilo zaklonovat 2 alely. Klon 2C má jiné spektrum pruhů než klony 2A a 2D.

Obr.5.9.: PCR-RFLP z vektoru (*Afa I*)



PCR-RFLP spektra po štěpení *Msp* I (5.10.) značí, že všechny tři zaklonované alely z rostliny 2 jsou navzájem odlišné. S největší pravděpodobností se jedná o tři různé alely z jedné rostliny.

Obr.5.10.: PCR-RFLP z vektoru (*Msp* I)



To, že se u odrůdy Odila při analýze jednotlivých rostlin nebyla již nalezena jiná alela než *A 10* lze vysvětlit několika způsoby. Je možné, že rostliny s jinou alelou se vyskytují v odrůdě jen ve velmi malém procentu, mezi jedenácti rostlinami nebyla zrovna přítomna žádná s jinou alelou. Také nelze vyloučit kontaminaci osiva, záměnu při setí nebo odebrání vzorků (nemělo by se stát). Mohlo také dojít ke kontaminaci DNA při izolaci. Druhá varianta se zdát být pravděpodobnější také proto, že odrůda Odila má podobný původ jako ostatní odrůdy, u kterých byla prokázána pouze alela *A10*.

U odrůdy Topas byla u všech analyzovaných rostlin PCR-RFLP spektra po štěpení *Mbo* I sice jiná než alela *A 10*, ale u všech rostlin stejné spektrum. Toto spektrum se shodovalo s jedním ze spekter u odrůdy Global. Potvrdilo se, že se jedná o alelu shodnou s alelou z Globalu, proto byla dále analyzována pouze alela z Globalu, z Topasu již ne. Jak následně ukázaly analýzy rostlin odrůdy Global, jeden enzym rozhodně nestačí pro důkaz o shodnosti alel. Štěpení pomocí *Eco* RI ukazovalo na dvě alely, ale další enzymy ukázaly alely čtyři. K odlišení neznámých alel pomocí PCR-RFLP je zapotřebí minimálně tří restriktivních endonukleáz. Daleko přesnější informace by se získaly pomocí kompletního sekvenování.

Většina AK odrůd řepky obsahuje ve svém genomu alelu *A10*, ale u *B. oleracea* a *B. rapa* bylo identifikováno velké množství alel *SLG* I genu (NOU ET AL. 1993), proto se dalo předpokládat, že u starších odrůd, kde materiál není plně homozygotní, se vyskytují alely jiné než *A10*.

Jiné alely než je alela *A10* byly také nalezeny kromě odrůd Topas a Global v odrůdách Zephyr a Bronowsky (DK 2051). Široká škála dominantních alel byla také potvrzena u různých druhů rodu *Brassica* pomocí PCR-RFLP a RFLP se sondou *A10* (SOBOTKA 2001, ROBERT ET AL. 1994).

Primery pro amplifikaci *SLG* genů třídy I jsou vysoce specifické a dávají amplifikační produkt pouze *SLG* I (Nishio et al. 1996). Sekvence primeru se nevyskytují ani v S-doméně *SRK* ani v ostatních genech příbuzných k *SLG*, proto se předpokládá, že nebyl amplifikován jiný úsek S-locusu, který by falešně mohl ukazovat na přítomnost další alely.

Existence různých alel v odrůdách by mohla být využitelná například pro kontrolu samosprášení a určení poměru hybridního osiva po křížení. Kromě toho by tyto poznatky mohly sloužit k rozlišení odrůd, ověření čistoty odrůdy a také by mohly přiblížit vývoj odrůdové skladby řepky. Rozdíly v jednotlivých alelách jsou snadno detekovatelné pomocí PCR-RFLP.

V neposlední řadě by také mohlo být zajímavé zaměřit se na fenotyp rostlin s jinou alelou. Teoreticky je možné, že by některá z dominantních alel byla funkční, to by mohlo přinést prospěch při dalším hybridním šlechtění řepky na bázi autoinkompatibility.

5.1.3. Analýza alel genu *SLG* II

Situace je do značné míry komplikována faktem, že řepka (*Brassica napus*) je allotetraploid vzniklý z druhů *B. oleracea* (genom C) a *B. rapa* (genom A). Jsou zde tedy dva genomy, z nichž každý přinesl své geny pro AI.

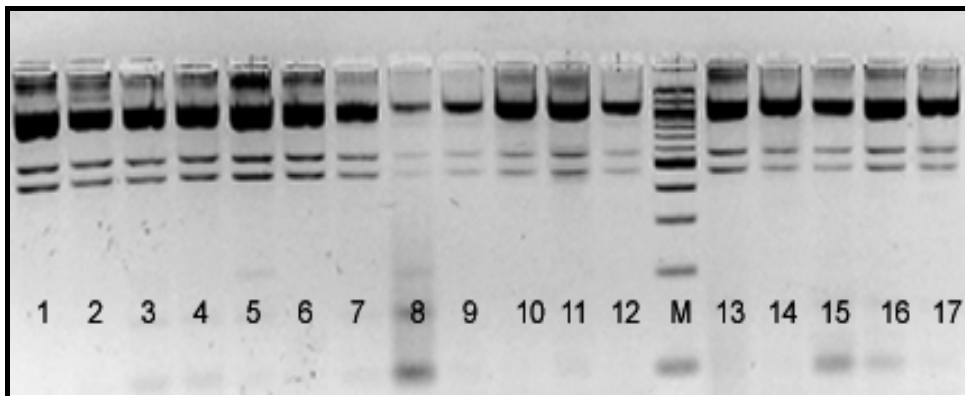
Problematika alely *S15*

V řepce je běžně rozšířený recesivní S-locus *S15* z *Brassica oleracea* (SOBOTKA 2001). V případě lokusu *S15* byla zjištěna silná tendence ke spontánnímu výskytu AK fenotypu (THOMPSON A TAYLOR 1971, GAUEDE ET AL. 1995). Je známá mutace, která má za následek nefunkční AI reakci na straně pylu (PASTUGLIA ET AL. 1997b). Pravděpodobně již od počátku vzniku řepky je tento S-locus nefunkční. Mutace v lokusu *S15* mohla usnadnit vznik řepky jako druhu, protože u čeledi *Brassicaceae* se AI reakce uplatňuje také při blokování mezidruhového opylení (HISCOCK A DICKINSON 1993). Ačkoliv *S15* má prokazatelně původ v *B. oleracea* (genomu C), je u řepky na genomu A (*B. rapa*) (GORING ET AL. 1993). Jak se

tento úsek dostal z jednoho genomu do druhého není zcela jasné, protože genomy spolu navzájem nerekombinují (BOHUON ET AL. 1996, PARKIN A LYDIATE 1997).

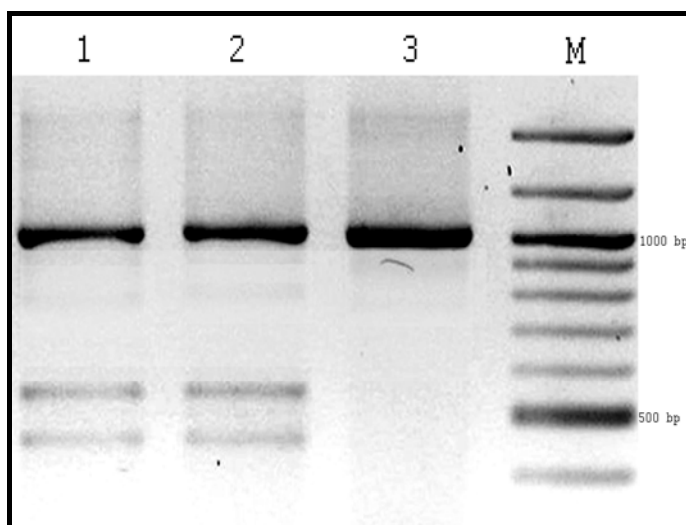
Sekvence alely *S15 SLG II* genu jsou známy a pro restriktazu *Eco RI* má jedno štěpné místo. Štěpí se na dva fragmenty o velikosti necelých 500 a necelých 600 pb. Podle PCR-RFLP spekter po štěpení enzymem *Eco RI* se *S15* vyskytuje u všech námi analyzovaných odrůd (Odila, Rasmus, Zorro, Navajo, Lirajet, Mohikan, Laser, Capitol, Pilot, Ramiro, Cando, Catonic, Orkan, Jesper, Global, Topas, Regent, Ceres, Falcon, Sonata, Arabela, Slapská Stela, Solida a Westar) (obr. 5.11.). SOBOTKA (2001) sekvenačně potvrdil *S15* alelu u AI linie WRG. PCR-RFLP (*EcoRI*) spektra odhalují *S15* alelu také u AI linií Start (obr. 5.12.) a Tandem . Na gelu jsou patrné dva fragmenty o velikosti necelých 500 a necelých 600 pb, což je rozštěpená alela *S15*. Dále zůstává část produktu nerozštěpena, kde je pravděpodobně druhá recesivní alela.

Obr. 5.11.: PCR-RFLP (*Eco RI*) - přítomnost alely *S15 SLG* třídy II u odrůd



Vzorky: 1-Odila, 2-Rasmus, 3-Zorro, 4-Navajo, 5-Lirajet, 6-Mohikan, 7-Laser, 8-Capitol, 9-Pilot, 10-Ramiro, 11-Cando, 12-Catonic, M-100 bp ladder, 13-Orkan, 14-Jesper, 15-Global, 16-Topas, 17-Regent

Obr. 5.12.: Ukázka rozlišení produktů amplifikace *SLG* třídy II pomocí PCR-RFLP (*Eco* RI) u AI linie Start



1 a 2 - vzorky po štěpení, 3- neštěpený vzorek, M-100 bp ladder

Pozornost alele *S15* již dále věnována nebyla, protože se jedná o známou a nefunkční alelu. *S15*-lokus je jedním z mála velmi dobře zmapovaných S-lokusů (CABRILLAC ET AL. 1999). Podle našich výsledků se vyskytuje u naprosto všech námi analyzovaných odrůd a linií, což souhlasí s tvrzením jiných autorů, že *S15* je přítomna u řady komerčních odrůd (PASTUGLIA ET AL. 1997b). *S15* lokus byl také nalezen u odrůd Zephyr a Bronowski (ROBERT ET AL. 1994). Prokázán byl i u jiných druhů *Brassicaceae* - *B. oleracea*, *B. oleracea alboglabra*, *B. campestris* Candle (ROBERT ET AL. 1994).

U některých odrůd (Westar) jsou v *SLG* genu *S15* lokusu popsány jednobodové mutace vzhledem k původní sekvenci z *B. oleracea* (PASTUGLIA ET AL. 1997b). Odlišnosti v jedné bázi by se velice jednoduše dalo využít například při sledování segregace lokusu *S15*. Je dosti pravděpodobné, že podobné mutace se vyskytují i u jiných odrůd.

Srovnání funkční alely *SLG* genu třídy II z genomu *B. oleracea* u AI linií

Materiálem byly autoinkompatibilní (AI) dihaploidní (100 % homozygotnost) linie Start a Tandem a WRG. Tyto linie jsou výsledkem dlouhodobého vyhledávání AI rostlin na pracovišti VÚRV Ruzyně.

Obecně lze říci, že u AK materiálu je v genomu C přítomna nefunkční dominantní alela (většinou *A10*), v genomu A nefunkční recesivní alela *S15*. U AI linií je pravděpodobně v genomu A nefunkční *S15*. Dominantní alela u tohoto materiálu přítomna není. V genomu C se předpokládá funkční recesivní alela.

Bylo prokázáno, že u všech tří zmiňovaných linií se amplifikuje pouze *SLG* gen třídy II, jde tedy o recesivní typ AI. U AI linií nebyl detekován dominantní S-lokus, *SLG* I se neamplifikuje ani při nízkých teplotách annealingu (SOBOTKA 2001). *SI5* byl zjištěn ve všech případech. Není vyloučené, že u této skupiny řepky, je *SI5* lokus stále v genomu *B. oleracea*. V druhém genomu by ale zcela jistě měl být recesivní (funkční) S-lokus (SOBOTKA 2001), který se zásadně se podílí na autoinkompatibilním charakteru.

U linie WRG se podařilo zaklonovat sekvenci unikátní pro tuto linii. Sekvenčně byl tento klon přes 90 % bází shodný s řadou recesivních *SLG* genů, mimo to v R1 generaci byl detekován pouze u AI jedinců. Pravděpodobně se podařilo zaklonovat aktivní gen (SOBOTKA 2001).

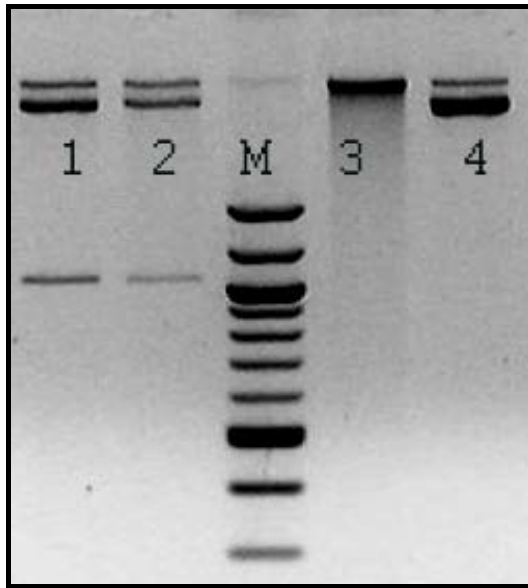
Sledované tři linie jsou navzájem kompatibilní, jedná se prokazatelně o různé S-haplotypy (SOBOTKA 2001). Předpokládá se tedy, že by měly mít rozdílné funkční S-alely. Cílem bylo osekvenovat funkční *SLG* třídy II také z odrůd Start a Tandem a potvrdit vzájemnou inkompatibilitu všech tří linií na molekulární úrovni.

DNA byla izolována kitem Invisorb, Spin Plant Mini Kit. PCR amplifikace genu *SLG* II byla provedena pomocí dvojice specifických primerů PS3 a PS21 (NISHIO ET AL. 1996).

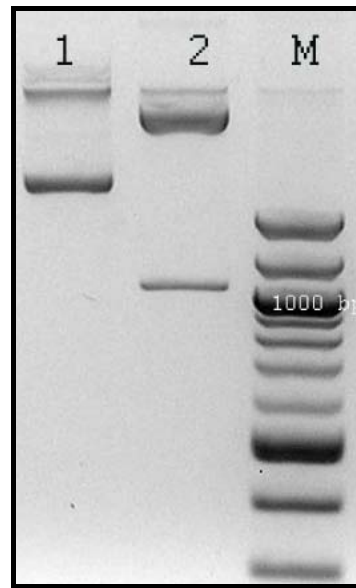
Současně s hledanou funkční alelou se amplifikuje alela *SI5*, proto byla před klonováním PCR reakce štěpena *Eco* RI, separací na gelu oddělena rozštěpená *SI5* od ostatních produktů. Nerozštěpené produkty (band cca 1 100 pb) byly z gelu vyříznuty a přečištěny pomocí kitu Jet quick, Gel Extraction Spin Kit, Genomed. Vyizolovaný band byl zaklonován do plazmidového vektoru pCR4-TOPO (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing) a následně byly vektorem transformovány bakterie *E. coli* (TOP 10). Po selekci transformantů byly jednotlivé klony napěstovány a plazmid s inzertem vyizolován kitem Invisorb, Plasmid Mini Kit. Úspěšnost klonování byla prokázána vyštěpením inzertu z vektoru restriktázou *Eco* RI a následnou elektroforézou. Plazmid má na obou stranách klonovacího místa štěpná místa pro *Eco* RI). Jak je patrné z obrázku 5.13. A, u linie Start byly úspěšně zaklonovány vzorky 1 a 2 (horní „dvojpruh“ o velikosti 3,9 kb = plazmid, pruh o velikosti něco cca 1100 pb = gen *SLG* II). Vzorky 1 a 2 byly osekvenovány. U vzorků 3 a 4 nebylo klonování úspěšné - na gelu je patrný pouze plazmid. U linie Tandem se podařilo získat pouze dvě kolonie vektorem (plazmidem) transformovaných bakterií. V kolonii 2 byl obsažen PCR produkt (5.13 B). Vzorek 2 byl sekvenován.

Obr. 5.13.: Kontrola úspěšnosti klonování PCR produktů u linií

A) Start



B) Tandem



Příprava pro sekvenování probíhala ve dvou PCR sekvenačních reakcích se značenými nukleotidy za použití primerů forward (T7) a reverse (M13). Samotné sekvenování bylo provedeno v Laboratoři molekulární fyziologie rostlin PřF MU v Brně

Pro vyhodnocování, kompletování a porovnávání sekvencí byl použit program BioEdit. Podařilo se osekvenovat funkční alelu *SLG* genu třídy II z genomu *Brassica oleracea* u AI linií Tandem a Start. Celkem byly získány tři sekvence (obr. 5.14.). Jedna kompletní ze Startu a jedna kompletní z Tandemu. Obě tyto sekvence jsou však shodné, rostliny vykazují podle sekvencí stejnou alelu. Byla získána ještě jedna nekompletní sekvence (polovina sekvence) ze Startu, která se nápadně odlišuje od ostatních. Linie WRG, kde byl *SLG* II gen osekvenován již dříve (SOBOTKA 2001), vykazuje odlišnou alelu.

Obr. 5.14.: Ukázka sekvencí

Start 1	1	10	20	30	40	50	60	
Tandem	1	CTCAAGTCCC	ACTGCTGCCG	GTTCTTGGGA	ACGAAACCCCTC	TAATACAGTT	ACAGTAAGGT	60
Start 2	1	CTCAAGTCCC	ACTGCTGCCG	GTTCTTGGGA	ACGAAACCCCTC	TAATACAGTT	ACAGTAAGGT	60
Start 1	61	70	80	90	100	110	120	
Tandem	61	GACGTGTTTA	GGTCACAGTA	AGAAATAAGAT	CCACAGAAAGT	AAAGAGAAATC	GCACACGTCC	120
Start 2	1	GACGTGTTTA	GGTCACAGTA	AGAAATAAGAT	CCACAGAAAGT	AAAGAGAAATC	GCACACGTCC	120
Start 1	121	130	140	150	160	170	180	
Tandem	121	GTTGGTAAAC	TCCAGAACAT	GCTCCATCCC	CATGATGGCG	GGATCCGCGT	GATTCGATTG	180
Start 2	1	GTTGGTAAAC	TCCAGAACAT	GCTCCATCCC	CATGATGGCG	GGATCCGCGT	GATTCGATTG	180
Start 1	181	190	200	210	220	230	240	
Tandem	181	AGTGCATAGT	CAGTGACTGT	CAATCTGGAG	TAGATGCTTT	GGTTGGTCAT	ATGGAACCTG	240
Start 2	1	AGTGCATAGT	CAGTGACTGT	CAATCTGGAG	TAGATGCTTT	GGTTGGTCAT	ATGGAACCTG	240
Start 1	241	250	260	270	280	290	300	
Tandem	241	TAAAGCATCT	CCTCACIGTT	CTCCGTATAA	TTGTAAACCA	TGTAATTTAA	TCCTTGACC	300
Start 2	1	TAAAGCATCT	CCTCACIGTT	CTCCGTATAA	TTGTAAACCA	TGTAATTTAA	TCCTTGACC	300
Start 1	301	310	320	330	340	350	360	
Tandem	301	TCCGGTATGC	CATTAAACTC	GATTCATTTC	CAAGGGCCGC	TCCTTTGCAT	TACAACACGT	360
Start 2	1	TCCGGTATGC	CATTAAACTC	GATTCATTTC	CAAGGGCCGC	TCCTTTGCAT	TACAACACGT	360
Start 1	361	370	380	390	400	410	420	
Tandem	361	TGATTCAAAA	ATCGATTTAT	AAGAATAAAC	TCAGGCAATC	CCCTTTGTAT	GTCCAGTTCG	420
Start 2	1	TGATTCAAAA	ATCGATTTAT	AAGAATAAAC	TCAGGCAATC	CCCTTTGTAT	GTCCAGTTCG	420
Start 1	421	430	440	450	460	470	480	
Tandem	421	TAGGTGAATT	TCCCGCTTGA	CGGATCGTCA	TAGGATCTCC	ATGATGTAAG	GAACCTGTTC	480
Start 2	1	TAGGTGAATT	TCCCGCTTGA	CGGATCGTCA	TAGGATCTCC	ATGATGTAAG	GAACCTGTTC	480
Start 1	481	490	500	510	520	530	540	
Tandem	481	CGCCCTGTTT	TGAATTCGTA	ACCTAGTTTC	ATCTCCGGAA	GTAAGATATC	TGTCGGAAAA	540
Start 2	1	CGCCCTGTTT	TGAATTCGTA	ACCTAGTTTC	ATCTCCGGAA	GTAAGATATC	TGTCGGAAAA	540
Start 1	541	550	560	570	580	590	600	
Tandem	541	TCGAAACTCT	GCCACAAGAA	TCCACTTGAG	TCTTTGTTGC	TGGAGTATCT	CATTACAAAA	600
Start 2	61	TCGAAACTCT	GCCACAAGAA	TCCACTTGAG	TCTTTGTTGC	TGGAGTATCT	CATTACAAAA	600
Start 1	601	610	620	630	640	650	660	
Tandem	601	TACCGTTGG	GAAGAAGCTC	TGCTATCACT	GGTATCTCA	CATTTTCTCT	AGTAAATATT	660
Start 2	121	TACCGTTGG	GAAGAAGCTC	TGCTATCACT	GGTATCTCA	CATTTTCTCT	AGTAAATATT	660
Start 1	661	670	680	690	700	710	720	
Tandem	661	GTGACCCAAA	CAGTGTATT	AGACTGACCT	AGCAAGACAA	GATTGTTTCC	AGAGATTTTG	720
Start 2	181	GTGACCCAAA	CAGTGTATT	AGACTGACCT	AGCAAGACAA	GATTGTTTCC	AGAGATTTTG	720
Start 1	721	730	740	750	760	770	780	
Tandem	721	AGGGTTCCAA	TGGAATTGGA	GAGAGGGTGT	TCTCTGTTTG	CGACCCATGC	GTAGGTTTTC	780
Start 2	241	AGGGTTCCAA	TGGAATTGGA	GAGAGGGTGT	TCTCTGTTTG	CGACCCATGC	GTAGGTTTTC	780
Start 1	781	790	800	810	820	830	840	
Tandem	781	TGGAGACTTT	TTTTATACCA	TATTCGAGA	TACCAACCGC	ACCGTCCAA	GGTTTGAAG	840
Start 2	301	TGGAGACTTT	TTTTATACCA	TATTCGAGA	TACCAACCGC	ACCGTCCAA	GGTTTGAAG	840
Start 1	841	850	860	870	880	890	900	
Tandem	841	AAACCAAGCT	CGAAGACTCC	ACCGTGGAGAT	ACAAGTGTTC	TATTGCTCGA	GATTGTGAGA	900
Start 2	361	AAACCAAGCT	CGAAGACTCC	ACCGTGGAGAT	ACAAGTGTTC	TATTGCTCGA	GATTGTGAGA	900
Start 1	901	910	920	930	940	950	960	
Tandem	901	GACTCTGAAG	ACGACAAAGT	GTTGACATAG	ATCGAAAGGG	CAGGATGAA	TAGATTCAG	960
Start 2	421	GACTCTGAAG	ACGACAAAGT	GTTGACATAG	ATCGAAAGGG	CAGGATGAA	TAGATTCAG	960
Start 1	961	970	980	990	1000	1010	1020	
Tandem	961	AAAGGAAGT	CTAGCAAGAA	CGAGAAGGTG	TAAAGAAATGG	GGAAATGTT	CTGTACCCCT	1020
Start 2	481	AAAGGAAGT	CTAGCAAGAA	CGAGAAGGTG	TAAAGAAATGG	GGAAATGTT	CTGTACCCCT	1020
Start 1	1021	1025	1021	1025				
Tandem	1021	TTCAAT	TTCAAT	TTCAAT				
Start 2	541	TTCAAT	TTCAAT	TTCAAT				

Černé rámečky označuje místa, kde se sekvence shodují u všech tří vzorků.

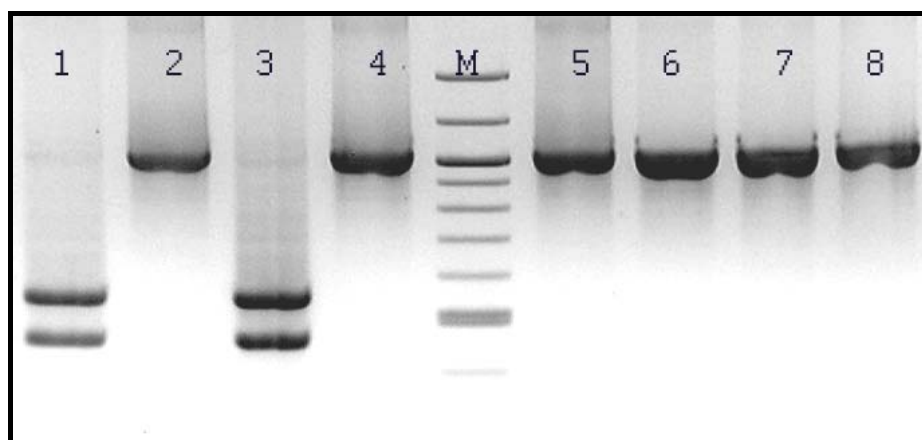
U kompletně osekvenovaných klonů byla pomocí programu BioEdit stanovena restriční místa pro restriktázy *Mbo* I, *Afa* I, *Msp* I, *Eco* RI a velikosti restričních fragmentů (obr. 5.15). Dvě kompletně získané sekvence byly stejné, proto i štěpná místa pro enzymy se shodují. Získaná data byla využita při PCR-RFLP (následující kapitola).

Obr. 5.15.: Stanovení restričních míst a velikostí restričních fragmentů

Enzym	Rozpoznávací místa	Frekvence	Pozice	Počet fragmentů	Délka fragmentů (pb) (celková délka 1025 pb)
<i>Mbo</i> I	'GATC	7	88, 162, 246, 443, 454, 634, 930	8	11, 74, 84, 88, 95, 180, 197, 296
<i>Afa</i> I	GTAC	1	1015	2	10, 1015
<i>Msp</i> I	C'CG_G	2	303, 516	3	213, 303, 509
<i>Eco</i> RI	G'AATT_C	neštěpí	-	-	-

Všechny tři plazmidy s úspěšně zaklonovanými alelami byly použity jako templát PCR-RFLP s enzymy *Mbo* I, *Afa* I, *Msp* I, *Eco* RI. Dále byly pro analýzu použity plazmidy se zaklonovanými PCR produkty pocházejícími z linie WRG (z předchozího výzkumu ing. Sobotky). Na obrázku 5.16. je výsledek po štěpení enzymem *Eco* RI. Vzorky 1-5 jsou původem z WRG, před klonováním zde nebyla odstraněna alela *S15*, která má jedno štěpné místo pro *Eco* RI. Jak je patrné z gelu, u vzorků 1 a 3 se pravděpodobně podařilo zaklonovat právě alelu *S15*. Vzorky 6 (Start 1 kompletně osekvenovaný) a 8 Tandem (kompletně osekvenovaný) nemají podle sekvencí štěpná místa pro *Eco* RI, což PCR-RFLP potvrzuje. Dalo se to očekávat, protože před klonováním bylo PCR podrobeno štěpení *Eco* RI. Vzorek 7 (nekompletně osekvenovaný z odrůdy Start) se také neštěpil.

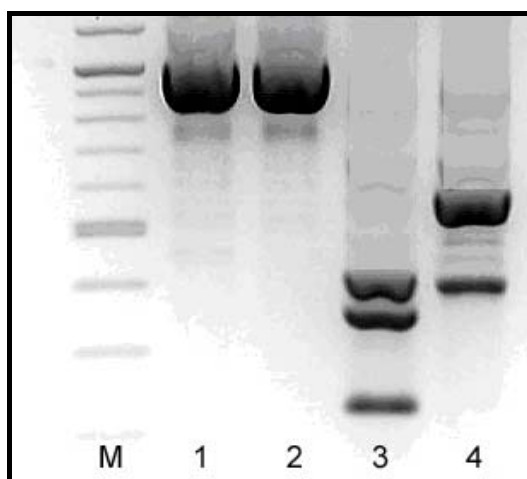
Obr. 5.16.: PCR-RFLP (templátem plazmid s inzertem) za použití restriktázy *Eco* RI



Vzorky 1 až 5 - WRG, vzorek 6 - Start 1 (osekvenovaný), vzorek 7 - Start 2, vzorek 8 - Tandem

Spektra PCR-RFLP s použitím restriktázy *Afa* I také povrdila správnost sekvenačních dat (obr. 5.17.). Vzorek 1 je kompletně osekvenovaný klon z odrůdy Start a vzorek 2 klon z odrůdy Tandem. Podle sekvencí by měla mít alela dvě štěpná místa, jeden dlouhý fragment 1015 pb a jeden velmi malý 10 pb, což odpovídá spektrům pruhů (velmi malý fragment 10 pb není viditelný na gelu). Vzorek 3 je klon z WRG, který byl již sekvenován (SOBOTKA 2001), dle sekvenčních dat se opět shodují velikosti fragmentů. Vzorek 4 je alela *SI5* z linie WRG, kde se opět shodují sekvenční data s PCR-RFLP. Podobné výsledky ukázala i spektra PCR-RFLP pro enzymy *Mbo* I a *Msp* I, zde však bylo větší množství fragmentů, proto byla spektra méně přehledná. Velikosti fragmentů se také shodovaly s velikostmi odvozenými ze sekvencí.

Obr. 5.17.: PCR-RFLP za použití restriktázy *Afa* I



Vzorek 1 - Start 1 (osekvenovaný), vzorek 2 - Tandem (osekvenovaný), vzorek 3 - WRG (osekvenovaná Sobotkou), vzorek 4 - WRG *SI5* alela

PCR-RFLP, kde templátem byl plazmid se zaklonovaným *SLG* II genem, ukázalo velmi názorně rozdíly/shody mezi alelami genu *SLG* třídy II u linií WRG, Start a Tandem. Zároveň tak byla potvrzena sekvenační data.

Tři použité linie Start, WRG a Tandem jsou autoinkompatibilní, ale navzájem kompatibilní (SOBOTKA 2001), což znamená, že mezi jedinci jedné linie nedochází k opylení, ale pyl z jedné linie opylí rostliny linií ostatních. Z toho vyplývá, že tyto tři linie by měly být odlišných S-haplotypů. Předpokládalo se, že by měli mít odlišné alely *SLG* II genu. Toto je potvrzeno u linie WRG, která má alelu *SLG* II genu odlišnou od Startu a Tandemu. U linií Start a Tandem je však situace nejasná. Kompletně osekvenovaná alela ze Startu je shodná s alelou z Tandemu.

Nabízí se různá vysvětlení, proč zaklonované alely *SLG II* u linií Start a Tandem jsou totožné. Prvním vysvětlením by bylo to, že Start a Tandem mají stejné haplotypy. To je však málo pravděpodobné, protože tyto dvě linie jsou navzájem fenotypově kompatibilní (SOBOTKA 2001). Nebylo již možné dále zjistit, zda dvě konkrétní rostliny, jejichž DNA byla použita k sekvenování, jsou navzájem kompatibilní.

Druhé vysvětlení vyplývá z fakt, že *SLG* není pro AI reakci klíčovým genem, má pomocnou úlohu při průběhu AI reakce (TAKASAKI ET AL. 2000) a není pro AI reakci bezpodmínečně nutný. Ačkoliv je obecně *SLG* gen vysoce polymorfní, logicky není důvod, proč by tento gen musel být odlišný u vzájemně kompatibilních linií, když se na samotné AI reakci zásadně nepodílí. Je tedy možné, že v případě Startu a Tandemu se skutečně jedná o dva různé haplotypy, ale alely *SLG II* genu jsou opravdu shodné.

Ke stejnému závěru o shodnosti alel *SLG II* u Startu a Tandemu dospěl i Sobotka (2001), ovšem pouze pomocí PCR-RFLP, proto byla potřeba geny kompletně osekvenovat. Domníval se však, že shody jsou jen zdánlivé z toho důvodu, že pro použité endonukleázy mají dvě různé alely stejné štěpné místo, nebo že by polymorfismus PCR-RFLP mohli maskovat alely z lokusu *S15*, které by se mohly amplifikovat ve větší míře než funkční alely. Že se pomocí PCR amplifikují i jiné geny z S-lokusu, které maskují PCR-RFLP polymorfismus, je sice také pravda (SOBOTKA 2001), ale zdá se však být velmi pravděpodobné, že v případě *SLG II* genu u linií Start a Tandem polymorfismus není jen maskován jinými produkty amplifikace, ale jedná se skutečně o dvě stejné alely.

Z výsledků lze usuzovat, že *SLG II* gen asi nebude úplně nejlepším markerem pro odlišení S-haplotypů. Tedy alespoň v případě linií Start a Tandem, kde se podle fenotypu jedná o dva různé haplotypy, *SLG II* gen tyto haplotypy nerozlišuje, proto se nedá v tomto případě použít.

Rozhodně byly nalezeny odlišnosti v *SLG II* mezi WRG a Startem s Tandemem. Zde by se dalo polymorfismu *SLG II* genů (na příklad pomocí PCR-RFLP) využít pro odlišení těchto dvou haplotypů a pro ověření hybridnosti po vzájemném křížení. Právě využitelnost PCR-RFLP genu *SLG II* pro ověření hybridnosti byla dále testována (následující kapitola).

Co se skrývalo pod neúplně osekvenovaným produktem ze Startu se nepodařilo zjistit. Nemělo by se jednat o jinou *SLG II* alelu, protože materiál byl homozygotní a DNA pocházela z jedné rostliny. Lze vyloučit, že by se jednalo o alelu *S15* z druhého genomu, protože ta byla před klonováním odstraněna. Pravděpodobně se jednalo o jiný gen z S-lokusu (možná S-doména *SRK*), které se v menší míře také amplifikují pomocí daných primerů

(Sobotka 2001). Amplifikovat se také mohou tzv. *S*-locus related genes (*SLR1* a *SLR2*) (WATANABE ET AL. 1992).

Navrhnout primery pro specifickou amplifikaci *SLG* II je velmi složité (na rozdíl od *SLG* I). Konzervativní úseky recesivních *SLG* genů jsou také v mnoha dalších genech (TANTIKANJANA ET AL. 1996). U řepky, na rozdíl od diploidních druhů, je situace komplikována tím, že se mohou amplifikovat některé úseky *S*-lokusu z druhého genomu. *SLG S15* alela sice byla před klonováním odstraněna, ale mohly se amplifikovat i jiné úseky *S15* lokusu, které se mohlo podařit zaklonovat.

PCR-RFLP genu *SLG* třídy II u linií Start a WRG

- stanovení využitelnosti této metody pro rutinní testování odlišnosti *S*-haplotypů

Byly nalezeny rozdíly v sekvencích *SLG* genů třídy II u linií WRG a Start (Tandem), rozdíly byly potvrzeny pomocí restriktivního štěpení. Bylo testováno, zda by PCR-RFLP *SLG* genů třídy II mohla být rychlá metoda pro odlišení jednotlivých haplotypů a zároveň metoda pro stanovení hybridnosti po křížení linií Start a WRG. Znalost sekvencí genu *SLG* II, umožnily kontrolu správnosti PCR-RFLP (odvození délky fragmentů). Ačkoliv sekvence genu *SLG* II u linií Start a WRG jsou prokazatelně odlišné, PCR-RFLP spektra genu *SLG* II byla podle SOBOTKY (2001) shodná, což vysvětluje právě nespecifickou amplifikací pomocí použitých primerů. Cílem bylo, zda PCR-RFLP genu *SLG* třídy II odlišuje linie Start a WRG a zda je možno tento polymorfismus využít pro stanovení hybridnosti potomstva po křížení těchto dvou linií.

Materiálem byly autoinkompatibilní (AI) dihaploidní linie Start a WRG a populace rostlin kříženců těchto dvou linií. Templátem pro PCR byly genomová kitem vyizolovaná DNA rodičovských a F_1 populací (i recipročně). Po PCR amplifikaci genu *SLG* II následovalo štěpení restriktázou *Afa* I, dále pak separace fragmentů na agarózovém gelu a hodnocení výsledných spekter pruhů.

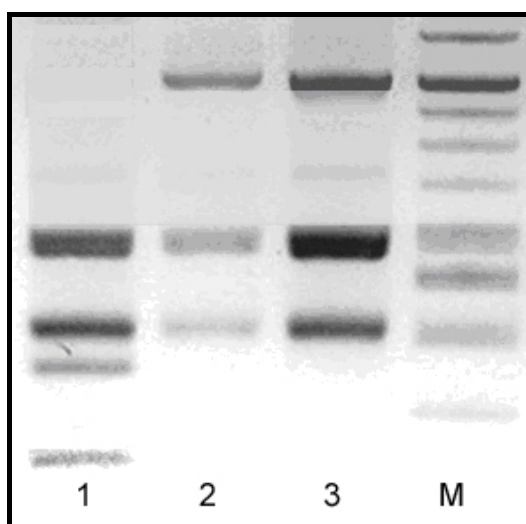
PCR-RFLP, kde templátem byla genomická DNA, ukázalo velmi názorně rozdíly mezi jednotlivým materiálem. Situace je komplikovanější oproti PCR-RFLP, kde byl templátem plazmid s jedním PCR produktem, protože z genomické DNA se amplifikují alely z obou genomů - z *B. rapa* alela *S15* a druhá alela z *B. oleracea*, která je funkční alelou a měla by být odlišná u daných linií.

Na obrázku 5.18. je vzorek 1 amplifikační produkt genů *SLG* třídy II po štěpení restriktázou *Afa* I z linie WRG. WRG má ve svém genomu alelu *S15* z *B. rapa*, která se štěpí

restriktázou *Afa* I na dva fragmenty, to jsou první dva pruhy odshora o velikosti přibližně 600 a 400 pb. Druhá alela (aktivní) se štěpí na tři fragmenty o velikosti 420, 370 and 230 bp, to jsou tři pruhy odspoda. Na gelu vidíme pouze 4 pruhy, protože kratší fragment z *S15* a nejdelší fragment z aktivní alely jsou přibližně stejně dlouhé, na gelu tvoří společný pruh (třetí odspoda).

Vzorek 2 a 3 na obrázku 5.18. jsou amplifikační produkty genů *SLG* třídy II po štěpení restriktázou *Afa* I z linie Start. Start má ve svém genomu opět alelu *S15*-fragmenty stejné velikosti jako u WRG *S15*. Druhá alela (funkční) se štěpí na jeden velký fragment o velikosti 1015 bp -nahore a druhý velmi malý (10pb), který není na gelu viditelný.

Obr. 5.18.: PCR-RFLP za použití restriktázy *Afa* I

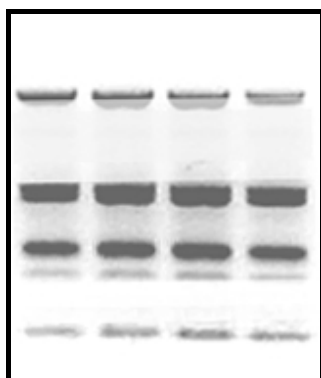


Vzorek 1 – WRG, vzorky 2 a 3 – Start

Dále byla testována vhodnost metody PCR-RFLP pro praktické účely, a to pro potřeby stanovení hybridnosti potomstva po křížení dvou autoinkompatibilních, avšak vzájemně kompatibilních, linií Start a WRG. Hybridní jedinci musí mít ve svém genomu alely od obou rodičů.

Na obrázku 5.19. je zachycena část gelu s produkty PCR-RFLP po štěpení restriktázou *Afa* I, kde templátem byla genomická DNA kříženců linie Star a WRG. Z obrázku je patrné, že je zde přítomno 5 pruhů (respektive 6), které odpovídají alele *S15* (je u obou rodičovských linií) - druhý a třetí pruh odshora, alele z WRG - třetí (shodný s pruhem z *S15*) čtvrtý, pátý pruh a alele ze Startu - první pruh a šestý (krátký, na gelu neviditelný). Spektrum je součtem spekter WRG a Startu z obrázku 5.17. Všechny analyzované rostliny byly podle spekter pruhů PCR-RFLP hybridní.

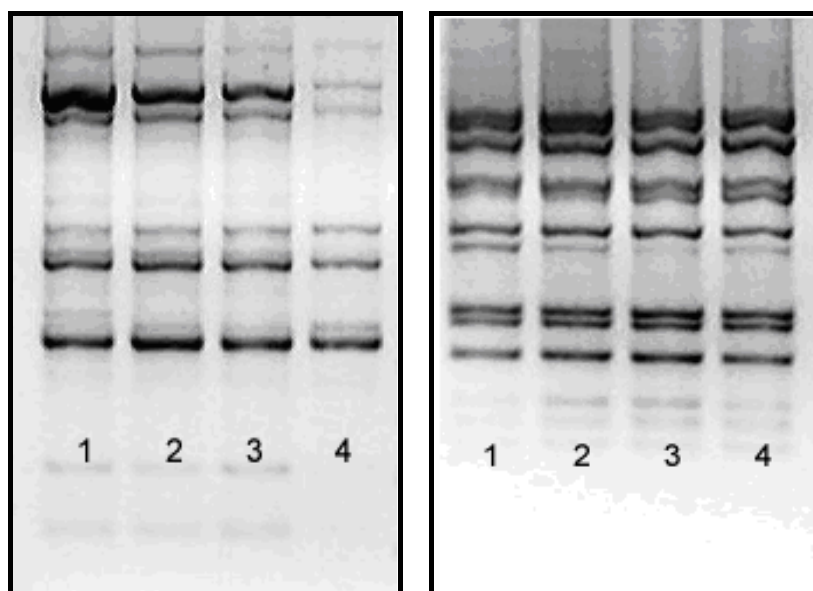
Obr. 5.19.: PCR-RFLP u kříženců Start a WRG za použití restriktázy *Afa* I



Stanovení hybridnosti potomstva po křížení AI linií Start a WRG pomocí RAPD

Pro účely stanovení hybridnosti byly také testovány RAPD primery. Bylo testováno 15 náhodně vybraných primerů z primerových sad Operon (A4, A6, A10, A15, A16, B1, B2, B4, B12, B18, F4, F17, K4, K2, K17). Žádný z těchto primerů však neodlišil ani rodičovské komponenty (obr. 5.20.).

Obr. 5.20.: RAPD spektra linií Start a WRG, vlevo primer A15, vpravo primer K12



Vzorky 1 a 2 – WRG, vzorky 3 a 4 – Start

K detekci polymorfismu jsou využívány PCR produkty z genomické DNA s použitím S-locus sekvenčně specifických primerů po štěpení různými restričními enzymy a gelové elektroforéze (BRACE ET AL., 1993; BRACE ET AL., 1994; NISHIO ET AL., 1996; NISHIO ET AL., 1997; PARK ET AL., 2001; PARK ET AL., 2002). Tento typ markeru byl popsán jako "cleaved amplified polymorphic sequences" (CAPS) (KONIECNY A AUSUBEL 1993). NISHIO ET AL. (1996) klasifikoval 18 z 27 testovaných linií *B. rapa* po působení *Afa* I na PCR produkty amplifikovanými s primery pro třídu I.

Rozdíly ve spektrech PCR-RFLP (*Afa* I) genu *SLG* II u linií WRG a Start jsou velmi názorné. Velikosti jednotlivých pruhů odpovídají velikostem odvozených ze sekvencí. Nezdá se, že by byl polymorfismus nějak výrazně maskován produkty nespecifické amplifikace.

Metoda PCR-RFLP velmi dobře rozlišovala jednotlivé alely genu *SLG* II, a to jak u jednotlivých zaklonovaných alel (předchozí kapitola), tak u dihaploidních rodičovských jedinců, ale také u kříženců dvou linií. PCR-RFLP spektra, resp. délka fragmentů se vždy shodovala s velikostmi fragmentů odvozených ze sekvencí. PCR-RFLP genu *SLG* II lze používat rutinně pro odlišení S-haplotypů, a to již v časně fázi ontogeneze. Toho je možné využít ke zvolení vhodné kombinace v hybridním šlechtění řepky na bázi autoinkompatibility, pro odlišení rodičovských populací a pro stanovení hybridnosti potomstva. Je však zapotřebí uvědomit si několik aspektů. V první řadě je nutné mít data podložená sekvenčně, vědět, zda rodičovské komponenty mají skutečně odlišné alely. Dále je potřeba znát štěpná místa pro jednotlivé restriktázy a podle toho volit enzym. Rozhodně není vhodné naslepo zkoušet řadu restričních endonukleáz. Enzym je nutné vždy volit tak, aby výsledné spektrum pruhů bylo dobře čitelné, obsahovalo optimální počet pruhů a rozdíly mezi analyzovanými vzorky byly dobře patrné. Pak je také potřeba nejprve otestovat rodičovské populace.

Jako ještě vhodnější metoda k odlišení S-haplotypů se možná jeví specifická PCR pro jednotlivé alely (SOBOTKA 2001). Znamená to navrhnout dvojici alelově specifických primerů, které amplifikují *SLG* (*SRK*, *SCR*) z jednotlivých funkčních alel jednotlivých S-locusů. V praxi by to mělo několik výhod. Odpadá tím jakékoliv štěpení a používání restričních endonukleáz. Konkrétně u *SLG* II genu by přítomnost PCR produktu znamenala přítomnost alely, u homozygotních rodičů jeden jediný pruh a dva pruhy u jejich hybrida. Zároveň by se neamplifikovala alela *S15*, která často ruší čitelnost spekter. Je třeba si ale uvědomit, že navrhnout specifické primery pro alely, které se liší v několika málo bázích, není vůbec snadný úkol. Vhodné by bylo, aby se od každé alely amplifikoval jinak dlouhý úsek,

protože jinak bychom nemohli rozlišit heterozygoty. Možná ještě obtížnější je navrhnout primery tak, aby se amplifikoval jen určitý úsek S-lokusu a nikoli směs produktů.

SOBOTKA (2001) ještě zdůrazňuje, že každý takový primerový pár je použitelný pouze pro jeden haplotyp, což by ale nemělo vadit pro praktické použití, protože šlechtitelé stejně pracují pouze s několika osvědčenými S-haplotypy.

Co se týče použitelnosti RAPD metody pro odlišení odrůd a následné využitelnosti polymorfismu pro stanovení hybridnosti, ukázala se metoda jako méně vhodná. Patnáct použitých primerů neodlišilo ani rodičovské komponenty. Jednou z příčin toho by také mohl být fakt, že dnešní odrůdy jsou si genotypově velmi blízké. RAPD by možná mohla odlišit vzdálenější odrůdy. MARSHALL ET AL. (1994) hledali RAPD markery pro odlišení hybridů. Autoři uvádějí, že testovali pře 500 RAPD primerů. Pro účely hybridnosti jsou RAPD spektra méně výhodná pro svoji problematictější reprodukovatelnost. Jako vhodné markery pro stanovení hybridnosti se zdají být spíše SSR markery, které jsou založené na polymorfismu mikrosatelitových sekvencí. Oproti RAPD a PCR-RFLP je nevýhodou SSR markerů požadavek na přesnější metodu separace (sekvenační gel) (SOBOTKA 2001) .

5.2. Hledání molekulárního markeru odolnosti k *Phoma lingam*

Cílem bylo rozpracování metodiky vytvoření specifického markeru, který by pomohl odlišit náchylné a odolné jedince rostlin řepky k fomové hnilobě pomocí DNA analýz již v časně fázi ontogeneze.

Ze současného sortimentu registrovaných odrůd řepky byly vyhodnoceny na základě statisticky významných rozdílů v laboratorních testech jako odolné dvě odrůdy Capitol a Jesper. Naopak náchylné jsou odrůdy Mohican a Orkan (PLACHÁ ET AL. 2002). Zahraniční autoři uvádějí podobné údaje o odrůdě Capitol. Jedná se však o specifickou rezistenci a během čtyřech let se většinou patogen adaptuje a rezistence je překonána (CETION, Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains 2004). U odrůdy Capitol byl potvrzen gen rezistence *Rlm1* (BALESTEND ET AL. 2002)

Vyhledání RAPD markeru pro odlišení náchylných (Mohican, Orka) a odolných (Capitol, Jesper) genotypů

Prvním krokem byla izolace DNA z děložních lístků rostlin odrůd Mohican, Orkan, Capitol, Jesper. Jednalo se o směsný vzorek cca dvaceti rostlin. Následovala PCR s nespecifickými primery, tzv. RAPD analýza. Byl proveden screening primerů z primerových sad Operon:

OPA 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20

OPB 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

OPK 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17

OPF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

OBK 3, 5, 6, 9.

Výsledná spektra pruhů byla porovnána. Pro další práci byly vybrány primery, které odlišují náchylné a odolné odrůdy. U těchto vybraných primerů byla reakce opakována, a to minimálně dvakrát, protože právě opakovatelnost někdy bývá u RAPD sporná (PENNER ET AL. 1993).

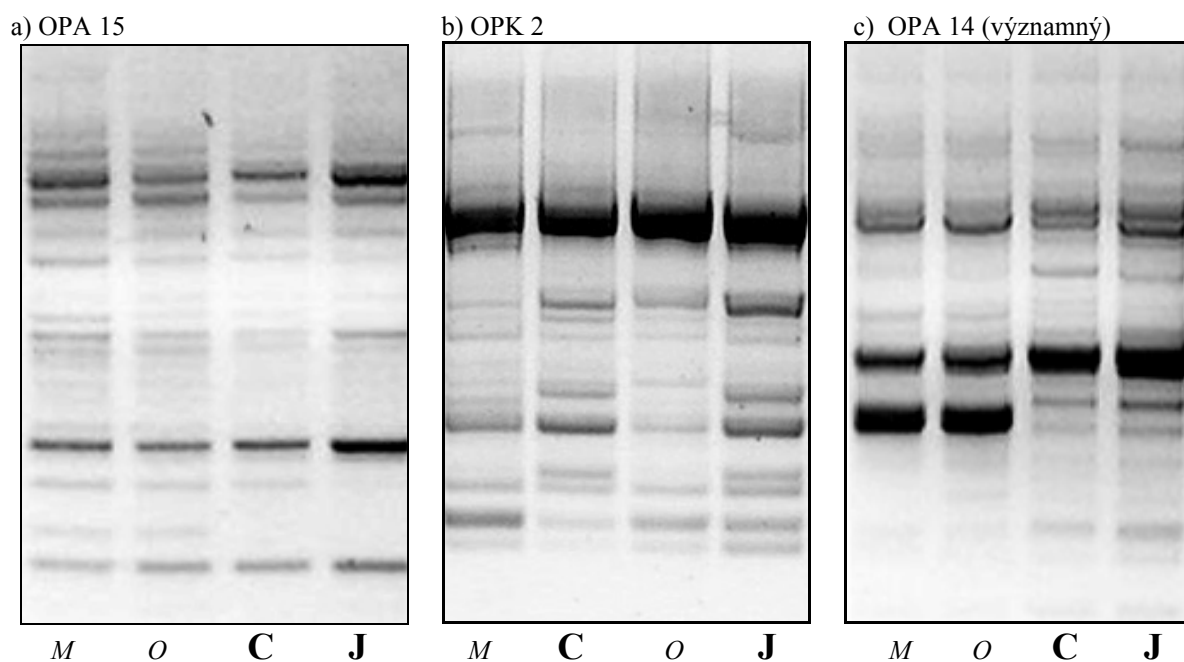
Rozdílná RAPD spektra (rozlišující dvojici náchylných a odolných odrůd, nikoli obecně variabilní spektra) byla patrná u produktů amplifikace s primery OPA 14 a 15; OPB 2; OPK 2; OPF 13 a 15 (ukázka některých spekter na obr. 5.1.). Pouze primer OPA 14 (obr. 5.21. c) vykazoval opakovatelnost. Jak je patrné z obrázku, jsou u výsledných spekter

s primerem OPA 14 zřetelné dva slabé pruhy (v oblasti velikostí produktů 600-700 pb) charakterizují odolné genotypy (Capitol, Jesper) a na druhé straně jeden silný pruh u genotypů náchylných (Mohycan a Orkan).

Data získaná z variabilních spekter RAPD byla použita pro odvození genetické vzdálenosti pomocí clusterové analýzy v programu Statistica. Jak ukazuje dendrogram na obrázku 5.22., odrůdy Mohican a Orkan (náchylné) jsou si vzájemně blízké. Nejvzdálenější odrůdou je odrůda Capitol. Odrůda Jesper se nachází mezi odrůdou Capitol a dvojicí náchylných odrůd Mohican a Orkan.

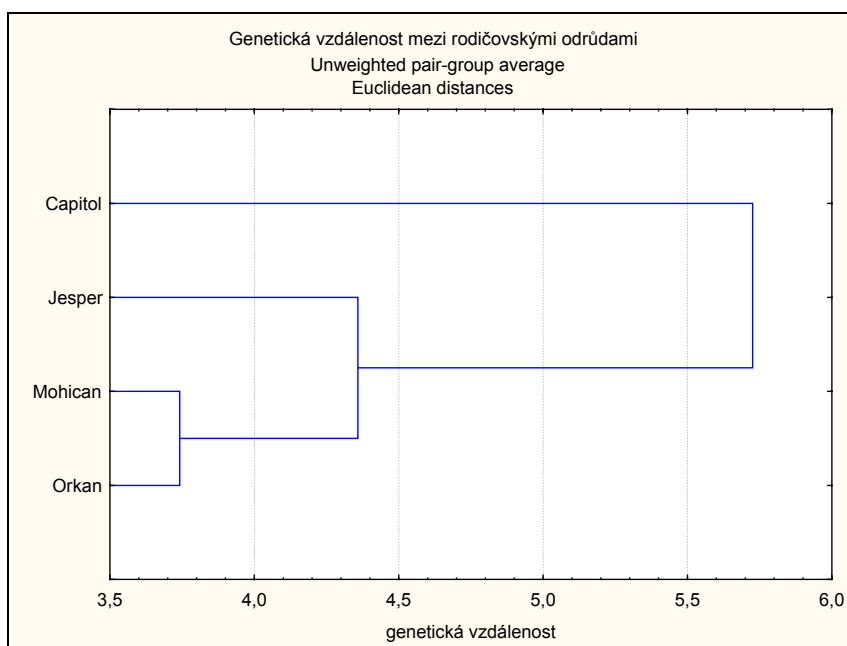
U odrůdy Capitol byl povrzen gen rezistence *Rlm1* (BALESTEND ET AL. 2002), proto byla pozornost zaměřena na tuto odrůdy. Čtyři primery odlišovaly odrůdu Capitol od ostatních (OPA 8, 9, 16, OPF 16 - obr. 5.23.).

Obr. 5.21.: Spektra RAPD, kde je patrná odlišnost mezi náchylnými a odolnými odrůdami.

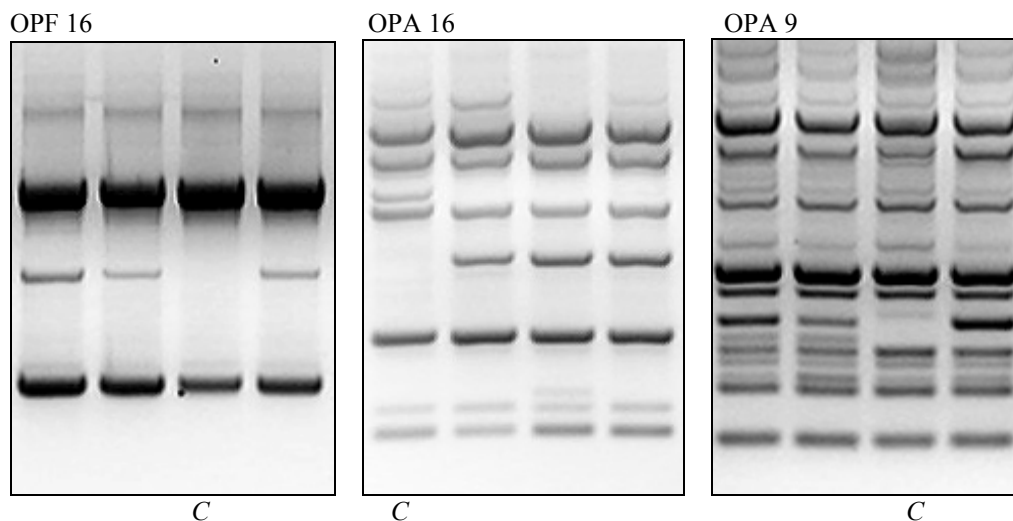


M - Mohican (náchylná)
O - Orkan (náchylná)
C - Capitol (odolná)
J - Jesper (odolná)

Obr. 5.22.: Dendrogram zobrazující genetické vzdálenosti mezi jednotlivými odrůdami



Obr. 5.23.: Primery, které odlišovaly odrůdu Capitol.



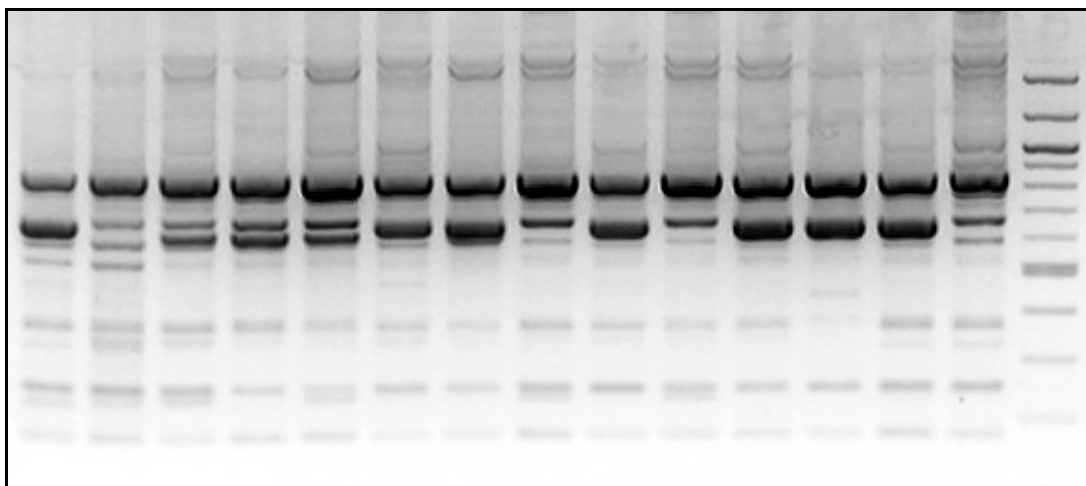
C- Kapitól

Ověření segregace markeru v F₂ generaci (resp. R₁ generaci) štěpící populace kříženců náchylné a odolné odrůdy. Stanovení korelace markeru s fenotypem (odolností), statistické hodnocení

Materiálem pro ověření segregace markeru byly F₂ štěpící (R₁) populace kříženců vždy jedné náchylné odrůdy s odolnou. Šlo o populace, které vznikly pylovou embryogenezí z F₁ populací po křížení (proto označení R₁). Tato technika odvození R₁ generace zaručuje 100 % homozygotnost potomstva. RAPD jsou markery dominantního charakteru (WILLIAMS ET AL. 1990), proto se předpokládá štěpný poměr v R₁ generaci 1:1 (50 % homozygotů dominantních a 50 % recesivních). DNA byla izolována z každé rostliny individuálně. Rostliny po odběru vzorku byly dále dopěstovány a podrobeny laboratornímu testu umělé infekce.

RAPD spektra s použitým primerem OPA 14 ukazovala rozdíly mezi náchylnými a odolnými genotypy a zároveň jako jediná vykazovala opakovatelnost a segregaci v F₁ štěpící populaci (obr. 5.24.).

Obr. 5.24.: Segregace RAPD produktů (primer OPA 14) v populaci F₁ kříženců (část populace).



Velmi důležité bylo srovnání genetických dat s fenotypem. Testování odolnosti (fenotypu) k *Phoma lingam* bylo provedeno na stejných rostlinách R₁ generace, které byly použity pro genetické analýzy. Testy probíhaly na pracovišti VÚOL Opava pomocí umělých infekcí. Předpokladem bylo, že pokud bude silná vazba mezi geny rezistence a nalezeným markerem, bude v populaci marker segregovat s fenotypem (přítomnost pruhu = odolná

rostlina, nepřítomnost = náchylná; či obráceně). Výsledky spekter rostlin F₁ populace byly srovnány s fenotypem.

Rozdíly ve fenotypu jednotlivých rostlin nebyly velké a ani infekce se neprojevila příliš rozdílnými příznaky. Okraje kolem vpichů byly pouze mírně zažloutlé nebo na počátku nekrotizace. Takové příznaky byla hodnoceny stupněm 2. V případě, že k nekrotizaci nedošlo a pletiva kolem poranění byla neporušená, byly tyto příznaky hodnoceny stupněm 1. Vyšší stupně nebyly použity, protože rozsáhlejší příznaky poškození pletiv se nevyskytly. Průměrné napadení (Disease index) bylo vypočítáno jako vážený průměr získaných hodnot.

Pro stanovení společné segregace markeru se skutečnou rezistencí (fenotypem) v F₁ populaci bylo použito takové hodnocení, že rostliny s indexem 1,5 a menším byly označeny jako odolné. Tyto rostliny by měly mít, tedy za předpokladu segregace markeru s fenotypem, ve spektru produktů amplifikace s primerem OPA 14 v oblasti velikostí 600-700 pb dva pruhy (jako odolné donorové genotypy Capitol a Jesper). Rostliny s indexem nad 1,5 byly označeny jako náchylné, měl by se u nich vyskytovat jeden silný pruh jako u náchylných donorových genotypů. Analyzováno bylo 83 rostlin.

Při tomto hodnocení nebyla shoda s fenotypem nijak výrazná. Nelze považovat za prokázané, že by marker segregoval s fenotypem. Shoda s fenotypem byla 47 %.

Rozpracování metodiky navržení specifického markeru pro odolnost k fomové hnilobě

Vytypovaný RAPD marker (primer OPA 14), který odlišuje rodičovské odrůdy, vykazuje opakovatelnost a segregace v R1 generaci a alespoň částečnou shodu s fenotypem, by mohl sloužit k vytvoření specifického markeru, označovaného jako SCAR marker (ARNEDO ET AL. 2002).

Ze spektra RAPD pruhů bude z gelu vyříznut (QIAquick Gel Extraction kit, QIAGEN) právě ten jeden, který odlišuje náchylné a rezistentní jedince. Produkt bude zaklonován do vektoru. Dále bude následovat sekvenování produktu a vyhodnocení sekvencí, na jejichž základě budou odvozeny specifické primery, což je cca 25 okrajových bazí produktu. Tyto primery by měly amplifikovat už pouze jediný úsek – specifický marker pro odlišení odolných a rezistentních rostlin.

Tak jako u velké části rezistence k houbovým chorobám se také u rezistence řepky k *Phoma lingam* jedná se o složitý typ dědičnosti, variabilita dědičnosti v odolnosti k fomě se především odvíjí od typu a rasy patogena (CARGEEG A THURLING 1979, DELWICHE 1980, HILL 1991, PANG A HALLORAN 1996). V různých fenofázích řídí odolnost rozdílné geny (ZHU ET AL. 2003) – kvalitativní, úplná rezistence v časných stádiích a kvantitativní, částečná rezistence u dospělých rostlin. Nelze opomenout, že přítomnost jednoho genu specifické rezistence znamená odolnost pouze vůči určité rase patogena (Genoscope, Centre national de séquençage 2004). Z těchto důvodů je velmi obtížné nalézt jeden konkrétní marker, který by kompletně odlišoval odolné a rezistentní jedince v různých podmínkách.

Vytypovaný RAPD marker získaný na základě amplifikace s primerem OPA14 se sice neshodoval ze 100 % s fenotypem v F₁ štěpící generaci, ale přece jenom je patrná jistá shoda. Je možné, že se tento marker fyzicky nachází v blízkosti nějakého z klastrů genů rezistence tohoto polygenního systému. Existence vazby a případně i její síla bude ještě testována.

Co se týká fenotypové zkoušky, byly u jednotlivých rostlin nalezeny jen minimální rozdíly. Je potřeba zkontrolovat, zda nedochází k disproporcím u rostlin stejného původu. Po získání semen fertálních rostlin by měl být test zopakován a proveden v řádném termínu na děložních lístcích. To je velmi důležité, protože právě v časných fázích vývoje se uplatňují specifické geny rezistence.

Výsledky ohledně časně detekce rezistentních rostlin řepky jsou využitelné ve šlechtění řepky v rámci spolupráce s VÚRV Praha-Ruzyně.

6. ZÁVĚR

Výsledky předkládané práce jsou jen dílčími výsledky výzkumu autoinkompatibility u řepky, což je jedna z náplní práce a zároveň již tradice Biotechnologického centra pod vedením profesora Čurna. Práce navazuje na výzkum Ing. Sobotky a Ing. Žaludové.

S úspěchem se podařilo rozlišit AI a AK rostliny na základě amplifikace genu *SLG I*. K odlišení (resp. selekci) AK rostlin se *SLG I* ukázal jako vhodný marker. V opačném případě se bohužel použít nedá, protože mezi rostlinami s nepřítomností *SLG I* byly i rostliny částečně kompatibilní. Bylo prokázáno, že většina současných odrůd má ve svém genomu dominantní alelu *SLG* genu třídy I - alelu *A10*. Podrobnější analýzy *SLG I* genu u odrůd Global a Topas odhalily existenci většího množství různých alel *SLG I* genu.

U všech analyzovaných odrůd byla potvrzena alela *S15* genu *SLG II*. Podařilo se osekvenovat funkční alelu *SLG* genu třídy II z genomu *Brassica rapa* u AI linií Tandem a Start. Předpoklad, že dvě vzájemně kompatibilní linie Start a Tandem mají odlišné alely *SLG II* genu se nepotvrdil. Linie WRG má však alelu jinou. Snahou bylo ověřit možnosti odlišení jednotlivých alel pomocí metody PCR-RFLP a stanovit využitelnost této metody pro rutinní testování.

PCR-RFLP genu *SLG II* může u materiálu, kde byly sekvenačně prokázány rozdílné alely, sloužit k odlišení jednotlivých haplotypů a stanovení hybridnosti po křížení. RAPD metoda se pro stanovení hybridnosti ukázala jako méně vhodná.

Co se týká markerů odolnosti k *Phoma lingam*, tak RAPD metoda velmi dobře odlišila náchylné a odolné genotypy donorových rostlin. Byla vytvořena sada DNA (RAPD) fingerprintů, na jejichž základě byl odvozován marker pro rezistenci k fomě. Pomocí metody RAPD fingerprintingu nebyl prokázán výrazný rozdíl mezi rezistentním a náchylným fenotypem v populaci rostlin mikrosporových regenerantů z F₁ kříženců rostlin odrůd Capitol, Jesper, Mohican, Orkan (donorové rostliny byly odlišeny, ale markery nesegregovaly přesně s fenotypem ve štěpící populaci). Nejlépe se jevil RAPD marker s OPA 14 primerem použitým pro amplifikaci, nerozlišuje sice stoprocentně odolné a náchylné jedince, ale částečná shoda byla nalezena. Dle souboru získaných dat byly pomocí clusterové analýzy stanoveny genetické vzdálenosti mezi jednotlivými odrůdami.

Některé poznatky získané během řešení problematiky disertační práce jsou však využitelné v oblasti hybridního šlechtění řepky na bázi autoinkompatibility a také v oblasti rezistentního šlechtění. Toto se děje ve spolupráci s VÚRV Ruzyně.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AKBAR M A (1989): Chromosomal stability and performance of resynthesized *Brassica napus* produced for gain in earliness and short-day responses. *Hereditas Landskrona* **111(3)**: 247-253.
- ARNEDO A S, GIL O R, LUIS A M, HORMAZA I (2002): Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **105(6-7)**:1067-1074.
- ARNISON P G (1997): Hybrid seed – new systems for the next century. Plant biotechnology institute bulletin, National research council Canada, January 1997, 2.
- BANKS P R, BEVERSDORF W D (1994): Self-incompatibility as a pollination control mechanism for spring oilseed rape, *Brassica napus* L. *Euphytica* **75**: 27 - 30.
- BALESDENT M H, ATTARD A, KHÜN M L, ROUXEL T (2002): Identification génétique de quatre régions génomiques impliquées dans les interactions spécifiques entre *Leptosphaeria maculans* et ses hôtes, *Brassica napus*, *B. juncea* et *B. rapa*.- Journées Jean Chevaugon, IVe rencontres de phytopathologie/mycologie,, 13.-17. 3. Aussois, Savoie, France.
- BARANYK P (2000): Využití heterozního efektu u řepky ozimé. Habilitační práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, 2000.
- BARANYK P ET AL. (2007): Řepka – pěstování – využití – ekonomika. Profi Press, 208 s.,ISBN 978-80-86726-26-7.
- BECHYNĚ M (1988): Výsledky mezidruhové hybridizace rodu *Brassica*. Nové poznatky v genetice a využívání heteroze, Praha, 1988.
- BRACE J, OCKENDON D J, KING G J (1993): Development of a method for identification of S alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. *Sex. Plant Reprod.* **6**: 133-138.
- 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.
- BOHUON E J R, KEITH D J, PARKIN I A P, SHARPE A G, LYDIATE D J (1996): Alignment of the conserved C genomes of *Brassica oleracea* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 833-839.
- 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.

- CABRILLAC D, DELORME V, GARIN J, RUFFIO-CHABLE V, GIRANTON J L, DUMAS C, GAUDE T, 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.
- CARGEEG L, THURLING N (1979): Seedling and adult plant resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) in spring rape (*Brassica napus* L.). *Aust J Agric Res* **30**: 37-46.
- CASSELMAN A L, VREBALOV J, CONNER J A, SINGAL A, GIOVANNI J, NASRALLAH M E, NASRALLAH J B (2000): Determining the physical limits of the *Brassica* S locus by recombinational analysis. *Plant Cell* **12**: 23-33.
- CETION, Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (2004)- [cit. 14. října 2004] Variétés de colza commercialisées en France en 2003. [online]. Aktualizace 20.5.03. <http://www.cetiom.fr>
- CETION, Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (2004)- [cit. 14. října 2004] Phoma du colza. [online]. Aktualizace 30.9.04. <http://www.cetiom.fr>
- CUI Y, BRUGIERE N, JACKMAN L, BI Y-M, ROTHSTEIN SJ (1999): Structural and transcriptional comparative analysis of the S locus regions in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell* **11**: 2217-1131.
- DEARNALEY J D W, LEVINA N N, LEW R R, HEATH I B, GORING D R (1997): Interrelationships between cytoplasmic Ca²⁺ peaks, pollen hydration and plasma membrane conductances during compatible and incompatible pollination of *Brassica napus* papillae. *Plant Cell Physiol.* **38**: 985-999.
- DEMEKE T, ADAMS R P, CHIBBAR R (1992): Potential taxonomic use of random polymorphic DNA (RAPDs): A case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* **84**: 990-994.
- 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 from the *Ogu*-INRA cytoplasmatic 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, BALESSENT M H (2004): A Cluster of Major Specific Resistance Genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* **94**:578-583.
- DELWICHE P (1980): Genetic aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance in rapeseed (*Brassica napus*). PhD thesis University of Wisconsin, Madison, Wis., USA.
- DE NETTANCOURT D (1977): Incompatibility in Angiosperms. *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York.
- DICKINSON H G (1995): Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* **8**: 1-10.

DIXIT R, NASRALLAH ME, 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 Physiology* **124**: 297-311.

DOWNEY R K, KLASSEN A J, STRINGAM G P. (1980). Rapeseed and mustard. In: Hybridization of Crop Plants. *American Society of Crop Science*. pp. 495-509.

EKUERE U U, PARKIN I A P, BOWMAN C, MARSHALL D, LYDIATE D J (2004): Latent S alleles are widespread in cultivated self-compatible *Brassica napus*. *Genome* **42**: 257-265.

OLLSON G (1960): self-incompatibility and outcrossing in rape and white mustard. *Hereditas* **46**: 241-252.

FÁBRY ET AL. (1992): Oil plants. Ministerstvo zemědělství ČR.

FERREIRA M, RIMMER S, WILLIAMS P, OSBORN T (1995): Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology* **85**: 213-217.

FRANSEN K J (1943): The experimental formation of *Brassica juncea* Czern. et. Coss. *Dansk Bot. Arkiv*. **11**(4):1-17.

FRANSEN K J (1947): (Plant Breeding Sta., Taastrup, Denmark) The experimental formation of *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. and *Brassica carinata* Braun. *Dansk Bot. Arkiv*. **12**(7):1-16.

FRAUEN M, WINKELMANN H E, BAER A, BRAUER D (2001): Hybridní odrůdy ozimé řepky: současný stav a budoucnost. In: Sborník, Seminář Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin 20.-22.11.2001, Hluk, sborník s. 199-205.

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.

FU T D, SI P, YANG X, YANG G (1992): Overcoming self-incompatibility in *Brassica napus* by salt (NaCl) spray. *Plant breeding* **109**, 255-258.

GAUDE T, ROUGIER M, HEIZMANN P, OCKENDON D J, DUMAS C (1995): Expression level of the *SLG* gene is not correlated with the self-incompatibility phenotype in the class II S haplotypes of *Brassica oleracea*. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1003-1014.

Genoscope, Centre national de séquençage (2004)- [cit. 14. října 2004] *Leptosphaeria maculans* Un champignon phytopathogène aux stratégies parasitaires complexes. [online]. Aktualizace 13.10.04. Dostupné na <http://www.genoscope.cns.fr>

GORING D R, GLAVIN T L, SCHAFER U, ROTHSTEIN S J(1993): An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *Plant Cell* **5**: 531-539.

GOWERS S.(1989): Self-incompatibility interactions of *Brassica napus*. *Euphytica* **42**: 99-103.

GRAND I, BEVERSDORF W D (1985): Heterosis and combining ability estimates in spring planted oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* **27**: 472-478.

HANSON M R (1991): Plant mitochondrial mutations and cytoplasmic male sterility. *Annu Rev Genet* **25**: 461-486.

HAVEL J. (1994): Use of self-incompatibility in breeding winter swede rape. In: *Rosliny Oleiste*, 15: 33-38.

HAVEL J (1996): Získávání autoinkompatibilních linií u řepky ozimé. *Genet. a šlecht.* **32**: 9-18.

HESLOP-HARRISON J (1975): Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual Review of Plant Physiology* **26**: 403-425.

HISCOCK S J, DICKINSON H G (1993): Unilateral incompatibility within the *Brassicaceae*. Further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 744-753.

HILL C (1991): Inheritance of seedling blackleg resistance in canola. Proc GCIRC 8th Int Rapeseed Congr, *Saskatoon* **1**: 286-291.

CHEN B Y, HENEEN W K (1989): Resynthesized *Brassica napus* L.: a review of its potential in breeding and genetic analysis. *Hereditas* **111**: 255-263.

CHEN C, NASRALLAH J B (1990): A new class of S sequences defined by a pollen recessive self-incompatibility allele of *Brassica oleracea*. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 241-248.

KONIECZNY A, AUSUBEL F (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype specific PCR based markers. *Plant J.* **4**: 403-410.

KOPRŇA R. (2007): Šlechtění řepky na kvalitu. In: Souhrny přednášek, XII. seminář šlechtitelů, MZLU v Brně, 7. února 2007, 7-9.

KOPRŇA R (2008): Využití hybridního systému *Ogu*-INRA při šlechtění řepky ozimé. Disertační práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, 2008.

KOUBOVÁ D (2005): Fomová hniloba řepky. Ústav zemědělské ekonomiky a informací, 2005.

KUČERA V, VYVADILOVÁ M, TOMÁŠKOVÁ D (1995): Development of self incompatible lines of winter rape by means of doubled haploid system. Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK 4-7 July, 89-91.

LABANA K S, GUPTA M L (1993): *Importance and origin*, pp. 1-20 in *Breeding Oilseed Brassica*, edited by K S LABANA, S S BANGA AND S K BANGA. Springer-Verlag, Berlin.

LUU D T, MARTY-MAZARS D, TRICK M, DUMAS CH, HEIZMANN P (1999): Pollen-stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 glycoproteins. *Plant Cell* **11** : 251-262.

- LEFORT-BUSON M, DANTE Y, GUILLOT-LEMAINE B (1987): Heterosis and genetic distance in rapessed (*Brassica napus* L.): Use kinship coefficient. *Genome* **29**: 11-18.
- MA CH, GERTSSON B, TUVESSON S, BENGTSSON L, DAYTEG CH, FU T (2003): Seed yield of self-incompatibility hybrids (*Brassica napus*) in China and Sweden. In: Proceedings from the 11th International Rapeseed Congress, Copenhagen, 6-10th July, 2003, 362-364, ISBN 87-7611-003-6.
- MAYERHOFER R, BANSAL V, THIAGARAJAH G, STRINGAM G, GOOD A (1997): Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus*. *Genome* **40**: 294-301.
- 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.
- MCNAUGHTON I H (1976): Turnip and relatives. In: Simmonds NW (ed.) *Evolution of Crop Plants*. London: Longman Group, pp. 45–48.
- MONTEIRO A, GABELMANN W A, WILLIAMS P H (1998): Use of sodium chloride solution to overcome self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Hort. Science* **23** (5).
- MORINAGA T (1934): Interspecific hybridization in *Brassica*. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytologia*. **6**:62–67.
- NAKANISHI T A HINATA K (1975): Self-seed production by CO₂ gas treatment in self-incompatibilite cabbage. *Euphytica* **24**: 117-120.
- NASRALLAH J B, KAO T H, GOLDBERG ML, NASRALLAH M E (1985): A cDNA clone encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* **318**: 263-267.
- 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.
- NASRALLAH J B, RUNDE S J, NASRALLAH M E (1994): Genetic evidence for the requirement of *Brassica oleracea* S-locus receptor kinase of self-incompatibility response. *Plant J.* **5**: 373-384.
- NESVADBA Z, MACHÁŇ F (1998): Šlechtění hybridní pšenice a hybridního triticales – současný stav a perspektivy. *Obilnářské listy*, 1/1998.
- NISHIO T, KUSABA M, WANATABE M, HINATA K (1993): Registration of S alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor Appl Genet.* **92**: 388 – 394.
- 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.
- NISHIO T, KUSABA M, SAKAMOTO K, OCKENDON D J. (1997): Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (*SRK*) in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 335-342.

- 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 Brussel sprouts. *Heredity* **33**: 159-171.
- OKAZAKI K, KUSABA M, OCKENDON D J, NISHIO T (1999): *Theor Appl Genet.* **98**: 1329.
- OLECHNOWICZ J, STACHOWIAK A, JEDRYCZKA M, CHÈVRE M (2004): Effects of temperature on *L. maculans* symptom development on cotyledons of oilseed rape with different resistance genes.- Abstrakt booklet: Biannual Meeting 2004, IOBC Working Group „Integrated protections in oilseed crops“, 30-21. 3. Rothamsted Research, UK.
- OLSSON G. (1960): Self-incompatibility and outcrossing in rape and white mustard. *Hereditas* **46**: 159-177.
- PALLOIX A, HERVE Y, KNOX R B, DUMAS C (1985): Effect of carbon dioxide and relative humidity on self-incompatibility in cauliflower, *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* **70**: 628-633.
- PANG E, HALLORAN G (1996b): The genetics of blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not.) resistance in rapeseed (*Brassica napus* L.). II. Seedling and adult-plant resistance as quantitative traits. *Theor Appl Genet.* **93**: 941-949.
- PARK J I, NOU I S, LEE S S, KANG K K, WATANABE M (2001): Identification of S-genotypes by PCR-RFLP in breeding lines of *Brassica*. *Mol. Cells* **12**: 227-232.
- 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, LYDIATE D J (1997): Conserved patterns of chromosome pairing and recombination in *Brassica napus* crosses. *Genome* **40**: 496-504.
- PASTUGLIA M, ROBY D, DUMAS C, COCK J M (1997 A): Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S-gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* **9**: 49-60.
- PASTUGLIA M, RUFFIO - CHABLE V, DELOURME V, GAUDE T, DUMAS C, COCK J M (1997 B): A functional S locus anther gene is not required for the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* **9**: 2065-2076.
- PENNER G A, BUSH A, WISE R, KIM W, DOMIER L, KASHA K, LAROCHE A, SCOLES G, MOLNAR S J, FEDAK G (1993): Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Appl.* **2**: 341-345.

PILET M L, DUPLAN G, BARRET P, RENARD M, DELOURME R (1999) Genetics of blackleg resistance in winter rapeseed.- Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, 1999. Canberra, Australia.

PLACHÁ E, ODSTRČILOVÁ L, TÁBORSKÝ V, POLAK J, LEBEDA A, KUDELA V (2002): Sensitivity of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) to isolates of the fungus *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. Disease resistance in plant pathology. Proceedings of the 6th Conference of European Foundation for Plant Pathology, Prague, Czech Republic, 8-14 September 2002. *Plant-Protection-Science* **38**: Special 2, 572-574.

Renard M, Delourme R, Valleé P, Pierre J (1997): Hybrid rapeseed breeding and production. In: Proceedings of the International Symposium on Brassicas. Rennes, France, 23-27th Sept. 1997, 291-289.

RÖBBELEN G (1985): Züchtung von Hybridrapen. Bericht der Arbeitstagung Saatzuchtler, Gumpenstein, 173-185.

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.

ROUXEL T, WILLNER E, COUDARD L, BALESSENT M-H (2003): Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica* **133**: 219-231.

RUFFIO-CHABLE V (1998): Complexity of self-incompatibility phenotypa in *Brassica*: its measure and some thoughts about its genetic control. In: Proceedings of the International Symposium on Brassicas. Eds. GREGORIE T, MONTEIRO A A. *Acta horticulturae, Leiden*. p. 218-288.

SÁKOVÁ L, SOBOTKA R, ČURN V, (2002): Molekulární základ sporofytické autoinkompatibility. *Biologické listy* **67**: 41-57.

SAMPSON D R (1957): The genetics of self-incompatibility in the radish. *J. Heredity* **48**: 26-29.

SARKER R H, ELLEMAN C J, DICKINSON H G (1988): Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis, and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4340-4344.

SCHENCK H R, WOLF G (1986): Characterization of somatic *Brassica napus* hybrids by polyacrylamide gel electro-phoresis. *Plant Breed.* **97**: 72-74.

SCHOPFER C R, NASRALLAH M E, NASRALLAH J B (1999): The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**: 1697-1700.

SOBOTKA R (2001): Analýza genu SLG a jeho využití jako selekčního markeru ve šlechtění řepky olejné. Disertační práce. JU ZF v Českých Budějovicích, 2001.

SONG K M, SBORN T C (1992): Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyse. *Genome* **35**: 992-1001.

STEIN J C, HOWLETT B, BOYES D C, NASRALLAH M E, NASRALLAH J B (1991): Molecular cloning of putative receptor protein kinase gene encode at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8816-8820.

STONE S L, ARNOLDO M, GORING D R (1999): A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**: 1729-1731.

SUNDBERG E, GLIMELIUS K (1986): A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatic hybridisation, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant science* **43**:158-162.

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.

SUZUKI T., KUSABA M., MATSUSHITA M., OKAZAKI K., NISHIO T. (2000): Characterization of *Brassica* S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* **482**: 102-108.

TANTIKANJANA T, NASRALLAH M E, NASRALLAH J B (1996): The *Brassica* S gene family: molecular characterization of the *SLR 2* gene. *Sex. Plant Repord.* **9**:107-116.

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.

THOMPSON K F, TAYLOR J P (1971): Self-compatibility in kale. *Heredity* **27**: 459-471.

TU J, FU T, ZHANG Y, TIAN S, (1999): Studies on the recessives genetic male sterility and its genetic markers in rapeseed (*Brassica napus* L.). Progesting of the Tenth International Rapeseed Congress, September 26-29, 1998, Canberra, Australia.

U N (1935): Geonome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and its peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* **7**:389-452.

VAŠÁK J (1994): Řepka ozimá. Habilitační práce, VŠZ Praha, 1994.

VAŠÁK J A KOL (1997): Systém výroby řepky. Česká a slovenská pěstitelská technologie ozimé řepky pro rok 1997-1999. SPZO Praha, 1997.

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.

WATANABE M, ITO A, TAKADA Y, NINOMIYA C, KAKIZAKI T, TAKAHATA Y, HATAKEYAMA K, HINATA K, SUZUKI G, TAKASAKI T, SATTA Y, SHIBA H, TAKAYAMA S, ISOGAI A (2000): Highly divergent sequence of the pollen self-incompatibility (S) gene in class-I S haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *L. FEBS Lett.* **12**: 139-144.

WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, RAFALSKI J A, TINGEY S V (1990): DNA polymorphisms by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.

WRANA J L, ATTISANO L, WIESNER R, VENTURA F, MASSAGUE J (1994): Mechanism of activation of TFG-beta receptor. *Nature* **370**: 341-347.

ZHU BIN, RIMMER S R, ZHU B (2003): Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in two accessions of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**: 98-103.

ŽALUDOVÁ (2007): The structure and the function of the S-locus in oilseed rape (*Brassica napus* L.) - disertacni prace, ZF JU Ceske Budejovice, 2007.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AI - *autoinkompatibility*; autoinkompatibilita, autoinkompatibilní, cizosprašný
- AK - *autokompatibility*; autokompatibilní, samosprašný
- AVR - gen avirulence
- BSA - bovinní sérum albumin
- CMS – *cytoplasmic male sterility*; cytoplazmatická pylová sterilita
- DH - *doublehaploid*; dihaploid, dihaploidní
- DK - donor kvality
- F - fertilní protoplazma, v protoplazmě přítomny geny fertility
- F1,2,... - první, druhá, ... filiální (dceřinná) generace
- GLS – glukosinuláty
- ORF – *open reading frame*; otevřený čtecí rámec, úsek DNA vymezený iniciačním a terminačním kodonem
- PCR – *polymerase chain reaction*; polymerázová řetězová reakce
- PCR-RFLP - délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů, kombinace PCR a RFLP
- QTL – *quantitative trait loci*
- R - gen rezistence
- R1 - první dceřinná generace vzniklá pylovou embryogenezí
- RAPD - *random amplified polymorphic DNA*; polymorfismus náhodně amplifikované DNA
- Rf - jaderné geny fertility
- rf - mutované jaderné geny fertility
- RFLP - *restriction fragment length polymorphism*; polymorfismus délky restričních fragmentů
- Rlm - rasově specifické geny odolnosti vůči *Phoma lingam*
- S - sterilní protoplazma, v protoplazmě nepřítomny geny fertility
- SCAR - *sequence characterized amplified region*; sekvenčně specifický amplifikovaný úsek
- SCR - *S-locus cysteine-rich protein*; gen S-lokusu, kóduje samčí determinant
- SLG - *S-locus glycoprotein*; gen S-lokusu, funkce není přesně známa
- SLR1, 2, 3 - *locus related gene 1, 2, 3*; geny neležící na S-lokusu, pomocná funkce
- SP11 - *S-locus protein 11*; proudukt genu SCR
- SRK - *S-locus receptor kinase*; gen S-lokusu kóduje seri/threonin kinázu
- SSR - *simple sequence repeat*; marketrovací systém, principem je amplifikace mikrosatelitů

Pokud není uvedeno jinak, je autorem všech obrázků a fotografií Tomáš Nix.