

.....**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**  
**V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní obor:

Speciální produkce rostlinná

Katedra:

Rostlinné výroby a agroekologie

Téma disertační práce

**Využití vybraných selekčních molekulárních markerů  
při šlechtění řepky**

Autor :

Ing. Božena Kukolíková

Vedoucí práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

2012



**Školitel:** prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum, Česká Republika

**Annotace:** Výsledky shrnuté v této práci byly zaměřeny na využití molekulárního markerování ve šlechtění řepky olejné. Molekulární markerovací techniky se používaly při hodnocení polymorfismu S lokusu, tzv. lokusu sterility a genů, které na něm leží. Analyzovány byly soubory rostlin z experimentálních šlechtitelských populací pocházející ze speciálních šlechtitelských materiálů a soubory starých i moderních odrůd původem z domácího a zahraničního šlechtění. Dále se testovalo využití molekulárních selekčních markerů při vyhledávání rostlin s nízkým obsahem kyseliny linolenové.

**Grantová podpora:** NAZV 1G46061, GAČR 521/03/H160, GAČR 521/08/H042 a MŠMT 6007665806.

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za pomoc a cenné rady, kterých jsem v hojnosti využívala v průběhu celého doktorandského studia. Stejně tak i celému týmu Biotechnologického centra Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích děkuji za podporu a zázemí, které mi poskytovali při řešení této práce.





Prohlašuji, že jsem práci zpracovala samostatně a všechny použité literární zdroje uvádím v seznamu použité literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 10. 7. 2012

**1.**





# Abstract

Molecular marker technics are effective tools in breeding process. The first using of them was in second half of last century and now on, time is constantly developing and improving. Possibility of their using in early stages of growing and development of plants facilitates breeders selection suitable materials, curtailment breeding process and save time, finance and next inputs. Interspecific crossing of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa* led to development of *Brassica napus* var. *oleifera*. *Brassica napus* is amphidiploid with open pollination, it is naturally self-compatible (SC) plant but occasionally self-incompatible (SI) plant also occur in oilseed rape cultivars. SI is a special system how plant protect fertilization. In *Brassicaceae* family, there is present sporophytical type of SI reaction. This type of SI reaction is very fast and germination of pollen grains is blocked still on the stigma. In many causes pollen doesn't germinate but sometimes it is possible and subsequently the growing of pollen tube through papillar cell is blocked. The reaction is controlled by a single multiallelic locus – sterility locus (S locus). There were identified genes *SLG*, *SRK*, *SCR/SP11* on S locus. *SLG* and *SRK* are female determinant on the stigma and *SCR* is male determinant on the pollen grains.

The aims of this PhD Thesis were: to find a marker gene connected with SI reaction in order to select SI plant from segregating population of dihaploid breeding lines after crossing of SI line with SC donor for quality traits (GSL content). The results of molecular analyses were compared with outputs of phenotype (seed) test and were used for selection of new SI donors.

The second aim was to identify different alleles of *SLG* gene in the group of selected Czechoslovak, Czech and German oilseed rape varieties. The set of 32 German, Czech and Czechoslovak varieties of oilseed rape was analyzed by PCR, PCR-RFLP and RT-PCR techniques and different alleles were sequenced. The method of S haplotype determination used to analyse *SLG* gene polymorphism is based on PCR. Our research goals were to detect polymorphism and genetic structure of analysed varieties and SI/SC lines. We didn't observe significant differences depending up geographical origin of varieties. But we find out relevant

differences between individual oilseed rape varieties and lines. Regarding to the expression level, we detected higher expression in generative organs and in later ontogenetic phases of plant development. New alleles of *SLG* gene it was possible to isolate from the old varieties of oilseed rape, where S-alleles screening have been not practiced yet.

The AFLP method was used for evaluation of genetic polymorphism in the set of 32 Czechoslovak, Czech and German oilseed rape varieties. Analysed varieties were divided into two main classes according to geographical origin. Genetics distance of this group of varieties is not large. It is probably caused by breeder's cooperation on the small geographical area, using small number of varieties and breeding material for crossing and producing new cultivars.

The last aim was to find molecular marker of linolenic acid content in breeding materials. The genetic reduction of linolenic acid level increased the quality of rapeseed oil. The results demonstrated that linolenic acid content in rapeseed oil is under the genetic control of a small number of genes. This acid plays a big role in process of photosynthesis and its content is in range 6 – 12%. We used RAPD as molecular markers for selection of desirable plants with low content of linolenic acid. We analysed set of special breeding materials, originating from twelve crossings of offsprings of parental lines with low content of linolenic acid and line or variety with normal content of linolenic acid.

# Obsah





## 2. Úvod

Řepka je bezesporu nejvýznamnější olejninou České republiky. Dlouhodobě se také řadí mezi nejlépe finančně zhodnotitelné plodiny na našem trhu. Je významným přerušovatelem sledu obilnin v osevním postupu a díky svému rozvětvenému kořenovému systému i vhodným činitelem pro udržení dobré struktury půdy. Díky množství posklizňových zbytků, které se drtí a zapracovávají do půdy, dochází k jejímu obohacení živinami a řepka je tudíž dobrou předplodinou (Baranyk *et al.*, 2007).

Ve světovém měřítku získala řepka významné postavení mezi olejninami a v současné době se řadí již na druhé místo hned za sóju (FAO, 2008). V Evropě je řepka olejninou nejvýznamnější, neboť z celkové plochy olejnin 10,8 mil. ha tvoří 6,5 mil. ha právě řepka (Potměšilová a Adamec, 2009). Její význam vzrůstá spolu s narůstajícími cenami ropy. Stoupají i požadavky na množství a kvalitu oleje, ale i aditiv přidávaných do paliv motorových vozidel i na její využití průmyslové (Baranyk *et al.*, 2007).

Řepka patří mezi zemědělské plodiny s poměrně krátkou šlechtitelskou historií. Jako kulturní plodina pěstovaná pro olejnatá semena se vyskytuje v Evropě od 16. století, ale podle Otty (1888-1909) s dalšími údaji podle Kodyma (1869) se do Rakousko-Uherska zavedlo pěstování řepky koncem 18. století z Nizozemí, začátky intenzivnějšího prošlechtění a využití v potravinářství se datují až od 19. a 20. století (Fábry *et al.*, 1992). V Čechách se její pěstování ujalo hlavně v letech 1820 – 1839. Kolem roku 1890 začal v důsledku využívání jiných přírodních zdrojů energie jako plynu, petroleje a dalších ropných produktů, pokles osévaných ploch a pokračoval ještě v době meziválečné, kdy téměř ustalo její pěstování. Masivní nárůst ploch začal za 2. světové války, kdy v důsledku blokády kontinentu došlo k poklesu úrovně živočišné výroby a nedostatek tuků se řešil pěstováním olejnin zejména řepky a slunečnice. Mezi roky 1945 a 1975 se pěstovala tato plodina na výměrách od 18 do 37 tis ha (Fábry *et al.*, 1992). V roce 1983 byl zaveden tzv. Systém výroby řepky (SVŘ). Ten kodifikoval pěstování řepky, aby došlo ke snížení zaorávek vlivem tzv. vyzimování a zničení porostů škůdci a ke zpřesnění hnojení dusíkem. V této době došlo k velkému rozvoji jejího pěstování. V 90. letech se začala řepka využívat i mimo potravinářskou oblast jako energetická surovina a od roku 2000 se stala nejvýznamnější exportní komoditou rostlinné

výroby ČR (Vašák *et al.*, 2000). Pro podporu českého šlechtění řepky bylo koncem 90. let 20. století založeno konsorcium Česká řepka (Kučera a Vyvadilová, 2003).

Cíleným šlechtěním bylo dosaženo zásadní změny složení oleje a tím i jeho převedení z kategorie nejdleho oleje vhodného jen pro technické účely, na olej potravinářský s vhodnou skladbou mastných kyselin, který v mnohém předčí i velmi kvalitní olej olivový (Baranyk *et al.*, 2007). Zvýšení kvality oleje s sebou přineslo i zvýšení osevních ploch a zvětšení významu řepky jako zemědělské komodity. K 6. 9. 2011 se stav sklizně v ČR pohyboval na úrovni více než 370 tis. ha pěstované řepky při průměrném výnosu 3 t/ha.

Rozsah porovnávání genetické variability šlechtěných plodin je relativně nízký v porovnání k celkové genetické informaci jednotlivých rostlin. I když řepka olejná patří

do skupiny relativně pozdě zkulturnělých rostlin (Soltis *et al.*, 1998), její šlechtění se spolu s dalšími brukvovitými olejnami v posledních několika desetiletích velmi zintenzivnilo, avšak zaměřilo se jen na hospodářsky nejdůležitější směry. Dlouhodobým šlechtěním se snížila genetická základna odrůd řepky, tato změna distribuce znaků se projevila v celé oblasti šlechtění řepky a znesnadnila charakterizaci odrůd. Obdobná situace je i u dalších zemědělských plodin hodnocených rovněž na základě fenotypového charakteru, kdy se registrace a ochrana čistoty odrůd spoléhá také jen na nemnoho morfologických znaků (Nielsen, 1985; Lombard *et al.*, 2000).



### 3. Cíle práce a hypotézy

Tato práce se zaměřuje na ověřování markerovacích systémů, ale i na hledání nových markerů využitelných ve šlechtění řepky olejně.

Vlastní práce měla čtyři cíle a jim odpovídající hypotézy:

**1. Vyhledávání AI rostlin v souboru speciálních šlechtitelských linií vzniklých na základě křížení donorů AI a donorů kvality na základě molekulární analýzy genu *SLG I*. Identifikace alel genu *SLG I* a hodnocení stability markeru v souboru šlechtitelských linií.**

*Hypotéza: Marker založený na genu *SLG I* je spolehlivým markerem pro určování autoinkompatibilních rostlin v jakémkoli souboru rostlin řepky olejně. Molekulární marker pro detekci AI rostlin je jednoznačný, přesný a nemění se v závislosti na použitém materiálu ani na čase.*

**2. Vyhledávání nových zdrojů autoinkompatibility a dalších alel genu *SLG I* v rámci souboru československých, českých a německých odrůd.**

*Hypotéza: Je známo, že způsob šlechtění čistých inbredních linií neumožňuje, ba přímo zabraňuje výskytu autoinkompatibilních rostlin, neboť jsou pro tento způsob směr šlechtění nežádoucí. Toto šlechtění se provádělo několik desítek roků a došlo tak ke snížení počtu alel, které se v současných moderních odrůdách nachází. V rámci souboru starých odrůd se bude vyskytovat velké množství různých S alel a naopak v souboru moderních odrůd bude patrný jejich výrazný úbytek.*

**3. Stanovení míry podobnosti československých, českých a německých odrůd.**

*Hypotéza: Předpokládá se, že odrůdy pocházející ze stejné oblasti šlechtění, budou vykazovat vysokou míru podobnosti.*

#### **4. Testování markeru pro rozlišení rostlin s různým obsahem kyseliny linolenové.**

*Hypotéza: Molekulární marker umožňující rozřídění rostlin s různým obsahem kyseliny linolenové (sníženým a běžným obsahem kyseliny linolenové) je dostatečně citlivý a umožňuje bezpečné rozpoznání a odlišení donorů těchto znaků.*

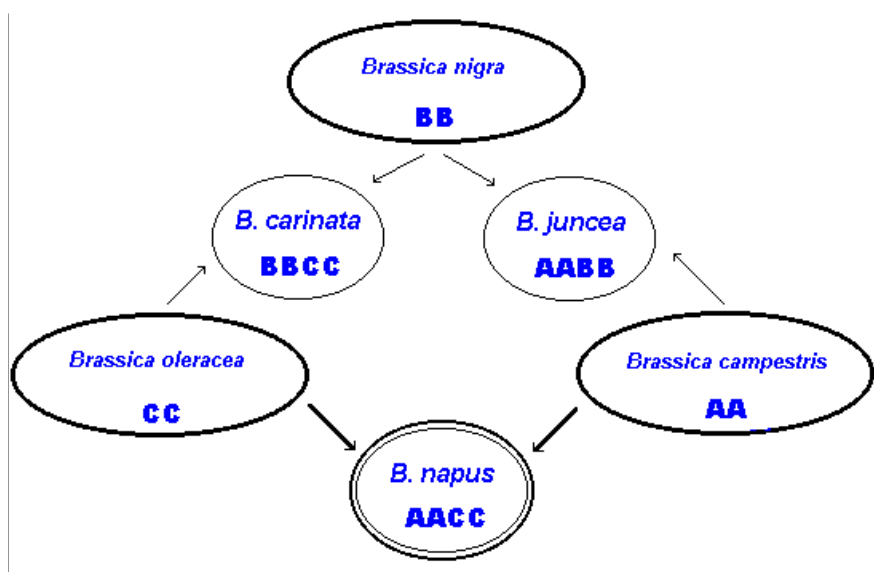
## 4. Literární přehled

V literárním přehledu jsou shrnuty dostupné informace o řepce jako rostlině, jejím pěstování, šlechtění, ale i nejnovější poznatky týkající se hledání molekulárních markerů a jejich využití ve šlechtění řepky olejné v poslední době.

### 1. Charakteristika rostliny z pohledu genetiky

Původní výskyt řepky je vázán na středomořské genové centrum spolu s brukví zelnou a řepicí ladní. Řepka se pěstuje ve dvou poddruzích: *Brassica napus* L. subsp. *napus*, brukev řepka olejka a *Brassica napus* L. subsp. *rapifera* Metzger, brukev řepka tuřín (Hejný a Slavík, 1992). Je řazena do rodu brukev (*Brassica*) a spolu s dalšími asi 170 rody a 2000 druhy do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) (Diepenbrock *et al.*, 1999). U řepky nebyl nalezen planý předchůdce (podobná situace je i u kukuřice). Jde fylogeneticky o velmi mladý a dosud značně proměnlivý a vitální druh, který vznikl jako amfidiploid s  $2n = 20$  chromosomy ve složeném genomu AACC po spontánním křížení brukve zelné (*Brassica oleracea*) s  $2n = 38$  chromosomy s genomem AA a řepice ladní *Brassica rapa* L., syn. *Brassica campestris oleifera* (DC.) Metzger) s  $2n = 18$  chromosomy a genomem CC (Schwanitz, 1967; Fábry *et al.*, 1992; Labana a Gupta, 1993; Murphy, 1994). Schéma původu řepky viz obr. č. 1.

Obr. č. 1: Schéma původu řepky (upraveno dle Fábry (1992)).



Rod *Brassica* obsahuje podle Currana (1962) asi 50 druhů, o kterých se soudí, že vznikly ze společného předka s 10, případně 8 či 12 chromosomy.

Kulturní druhy rodu *Brassica* se podle počtu chromosomů rozdělují do třech základních skupin s genomy označovanými jako A, B, C. U monogenomických druhů se na základě chování chromosomů v průběhu mitózy, na základě cytologických studií, uvažuje o jejich společném nyní už vymizelému předkovi se základním chromosomovým číslem  $x = 5$  nebo 6, což je ještě méně než předpokládal Curran v roce 1962. Základní druhy pravděpodobně vznikaly z tohoto předka procesem autopolyloidie následované eliminací některých chromosomů a strukturálními přestavbami genomu (Downey *et al.*, 1980; Röbbelen, 1985; Labana a Gupta, 1993). Tuto domněnku o hybridním původu poprvé potvrdil cytotaxonomickými experimenty Morinaga (1934). O rok později ji svými pracemi doplnil U (1935) a šlechtitelskými a hybridizačními experimenty byla potvrzena Frandsen (1943, 1947). Konečný a ucelený obraz vzniku tohoto druhu byl podán na základě molekulárně genetických analýz, pomocí RFLP analýzy jaderné DNA, cp DNA a mtDNA (Song a Osborn, 1992) nebo na základě RAPD markerů (Demeke *et al.*, 1992).

V současné době je zejména v zahraničí ve šlechtění mimo jiné vyvíjena snaha o využití resyntetizované rostliny 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).

## **2. Pěstování řepky**

Pomineme-li zařazení řepky v osevním sledu, vysévané množství semen a další agrotechnické zásahy a termíny, můžeme pěstování řepky rozdělit na dva hlavní směry:

### **Kvalita produkovaného oleje**

Nejprve se pěstovaly odrůdy řepky s vysokým obsahem kyseliny erukové (KE) a vysokým obsahem glukosinolátů (GSL). V 70. a 80. letech se začaly pěstovat odrůdy se sníženým obsahem KE ale nesníženým obsahem GSL tzv. „0“ odrůdy. Pak následovaly „00“ odrůdy se sníženým obsahem KE do 2% a GSL do 25  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  semene. V současnosti se

šlechtí tzv. „000“ žlutosemenná řepka s minimálním obsahem KE a sníženým obsahem GSL a se sníženým obsahem vlákniny v semeni z cca 12 na 6 %, dále se pracuje na „0000“, kde je redukován i obsah nestabilní kyseliny linolenové. V omezeném rozsahu se začaly pěstovat i odrůdy „EO“ s vysokým obsahem KE nad 50% a sníženým obsahem GSL pro průmyslové účely. Jejich pěstování je však diskutabilní, protože je velmi těžké zabezpečit důkladnou izolaci od odrůd pěstovaných pro potravinářské účely. V poslední době už vývoj pokročil až k transgenním neboli geneticky pozměněným odrůdám s geny rezistence proti herbicidům (Baranyk, 2000).

### **Pěstování odrůd různých genetických typů podle vývoje úrovně šlechtění**

Vývoj šlechtění řepky postupoval od krajových odrůd přes syntetické populace k liniovým odrůdám, kde se využívalo 60% podílu samosprašných rostlin. Současně s liniovými odrůdami probíhá intenzivní šlechtění hybridních odrůd zejména na bázi samčí a cytoplazmatické samčí sterility. V současnosti se vyvíjí i nové typy odrůd a to transgenní a nově i hybridní transgenní odrůdy, které by měly být vrcholem šlechtitelského snažení. (Vašák *et al.*, 1997; Baranyk, 2000).

### **3. Šlechtění řepky olejné**

Šlechtění nových odrůd bylo a stále je primárně zaměřeno na zvýšení výnosu i kvality, postupně se však přidávaly další znaky jako zvýšení odolnosti chorobám a škůdcům. Hodnocení a identifikace odrůd a šlechtitelských materiálů probíhala standardně na základě morfologických znaků.

Zprvu se při tvorbě nových odrůd používala metoda výběru, posléze se k ní přiřadila i metoda křížení, následné ustalování znaku a oddělené pěstování vybraných jedinců. V současnosti se používá několik způsobů šlechtění nových odrůd řepky olejné, a to liniové šlechtění anebo šlechtění hybridní. Při tradičním liniovém šlechtění vznikají kvalitní odrůdy s dobrými vlastnostmi vhodnými pro různé pěstitelské oblasti a cíle pěstování, ale i komponenty pro tvorbu odrůd hybridních, nevýhodami vytváření tohoto typu odrůd může být nízká návratnost nákladů z pohledu šlechtitele. Liniové odrůdy si své dobré vlastnosti zachovávají i při přesévání, a tudíž mohou pěstitelé využívat k seti bez větších obtíží i tzv.



	(velký počet linií)	(velký počet linií)			počet licencí)	
<b>Příklady odrůd</b>	Synergy, Betty	Embleme	Extra, Vectra	u nás	Balur, Talent,	zatím nejsou
			Executive	neregistrovány	Pronto, Kapitan, Artus	
<b>Obnova fertility</b>	O	O	spolehlivá (málo spolehlivá)	spolehlivá	spolehlivá	spolehlivá
<b>Náklady na výrobu osiva</b>	běžné	běžné	běžné	nízké	vysoké	běžné, vysoké
<b>Specifické problémy</b>	opylení	opylení	kvalitní obnovitel fertility	acceptovatelnost GMO	udržovatel samčí sterility	kvalita semen

Jsou známy ještě další systémy tvorby hybridních odrůd objevené zejména v Číně, ale jejich použití je zatím jen okrajové (Koprna, 2007).

#### 4. Způsoby identifikace odrůd

Cílené šlechtění s sebou přineslo riziko zúžení genetické základny kulturních rostlin a může se tedy s jistotou očekávat zvýšení obtížnosti identifikace jednotlivých odrůd řepky na základě jejich fenotypu. Inspektoři ÚKZÚZ se s podobnou situací potýkají už i při registračních zkouškách a DUS testech (Distinctness Uniformity Stability tests) pro právní ochranu u nově vyšlechtěných odrůd, kdy se pro určení odrůd používá omezený počet morfologických znaků (UPOV, 2002). A to při současném trendu neustále se zvyšujícím počtem nově přihlašovaných odrůd, tuto situaci zhoršuje natolik, že je z dlouhodobého hlediska neudržitelná. Rozpoznávání odrůd na základě morfologických znaků je v mnoha případech nemožné. Ke zvýšení účinnosti registračního řízení jsou proto požadovány stále nové metody testování (Čurn a Žaludová, 2007). Nejprve se k doplnění morfologického způsobu odrůdové identifikace přiřadily izozymové analýzy (Arús *et al.*, 1982, 1983). Tyto analýzy umožňují větší přesnost pozorování genotypu odrůdy, nevýhodou je omezený počet izozymových markerů (Arús *et al.*, 1985, 1991). Ze získaných poznatků vyplývá, že ke zpřesnění DUS testů by mohlo dojít používáním DNA markerů (Ainsworth a Sharp, 1989, UPOV, 2002), které mohou odrůdu určit mnohem přesněji, rychleji a efektivněji. Tyto typy markerů se využívají např. i k vyhodnocení genetické diverzity uvnitř rodu brukev (*Brassica*)

(Alphey, 1997; Snowdon, 2004). Molekulární markery se všeobecně mohou používat jako potenciální techniky přesného určení jednotlivých odrůd. Ve srovnání s morfologickými znaky mají tyto markery mnoho výhod a jsou úspěšně používány při uznávacím řízení, při určování pravosti odrůd, kontrole odrůdové čistoty hybridních odrůd (Marshall *et al.*, 1994), ale i detekci transgenů (Hájková *et al.*, 2005). Relativně vysoký počet různých molekulárních technik a postupů je dostupný pro rostlinou genotypizaci. Markerovací systémy se odlišují v obsahu informací, počtu výsledných polymorfismů, stupni automatizace, pracnosti a výši finančních nákladů (Čurn a Žaludová, 2007).

K udržování vysoké úrovně registračního testování a zachování jeho hlavního poslání jsou pomocí molekulárních markerů získávány nové popisné charakteristiky jednotlivých odrůd. Ačkoli jsou v současné době dnes testovány různé morfologické a kvalitativní znaky i výnosové charakteristiky pro ochranu odrůd (ISTA a UPOV), k udržení účinnosti registrace a testů odlišnosti se neustále vyvíjejí nové markery. Garanci kvality nových odrůd zejména pro zemědělce a prodejce zajišťují DUS zkoušky, pro stanovení odlišitelnosti (distinctness), jednotnosti (uniformity) a stálosti (stability). Problematika určování stálosti, uniformity a jednoznačné identifikace odrůd je rovněž důležitá při ochraně samotných šlechtitelů (UPOV, 2002). Tato problematika je upravována úmluvou UPOV z roku 1991, kde se odvozenými odrůdami rozumí odrůdy pocházející a udržující genotyp stávajících odrůd, které jsou jasně charakterizované fenotypovými znaky, jako jsou jednoduše geneticky založené znaky. Tento pohled na danou otázku se však mění s nastupujícím vývojem technik genových manipulací a GMO technologií, jež umožňují cílené vnesení genu do již existujícího genotypu (Ondřej a Drobník, 2002).

U většiny druhů se stávající DUS testy spoléhají jen na klasické porovnávání a vyhodnocování morfologických znaků mezi sledovanými odrůdami a již registrovanými odrůdami (vybraný vzorek nejlepších odrůd). Testovací protokol má určitý počet limitujících faktorů. Pro protokol DUS testů je z ekonomických důvodů vyžadován jen minimálně nezbytný počet opakování (dvě lokality a dvě opakování na lokalitu podle norem EU), která však nevedou k odpovídajícím výsledkům, ale pouze k přibližnému odhadu interakcí mezi genotypem a prostředím. Zmiňované interakce mohou být důležité pro používání morfologických znaků, neboť jejich projev je přímo ovlivněn přírodními i pěstebními podmínkami. Testované odrůdy jsou proto porovnávány s kolekcí registrovaných odrůd, která



se rok od roku zvětšuje (Čurn a Žaludová, 2007). K doplnění morfologických znaků jsou využívány izozymové analýzy, jež mohou být také zahrnuty do DUS testů. V 80. letech minulého století byla většina izozymů a zásobních proteinů zkoušena mimo jiné jako vhodný markerovací systém pro odrůdovou specifikaci u různých druhů hospodářských plodin, mimo jiné řepku olejku (Čurn a Sáková, 1997; Gupta a Röbbelen; 1986, Mündges *et al.*, 1990). Analýzy izozymů umožňují přesnější pozorování genotypu odrůdy, ale nevýhodou je omezený počet izozymových markerů. Další nevýhodou biochemických markerů u odrůd řepky se zdá být jejich relativně nízká úroveň polymorfismu (Lee *et al.*, 1996), nejpravděpodobnějším vysvětlením tohoto jevu je vysoká úroveň genetické podobnosti moderních odrůd. Isozymy však mohou velmi dobře odlišit řepku od ostatních brukvovitých (*Brassica oleracea*, *Brassica rapa* atd.), ale pro identifikaci jednotlivých odrůd řepky je potřeba využít doplňkového markerovacího systému pro přesný popis odrůd (Čurn a Sáková, 1997).

## **5. DNA markery používané ve šlechtění řepky**

DUS testy mohou zlepšovat a zpřesňovat své výsledky používáním DNA markerů, které jsou účinnější a po finanční stránce efektivnější. Molekulární markery mohou být všeobecně a spolehlivě použity jako potenciální techniky identifikace odrůd. Ve srovnání s morfologickými znaky mají molekulární markery nesporně více výhod. Jejich projev je nezávislý na přírodních podmínkách, a tudíž odpadá zdlouhavé sledování průběhu růstu a potenciální počet využitelných genetických markerů není téměř limitován ve srovnání s izozymy. Molekulární markery jsou s úspěchem používány při registračním řízení jako např. při identifikaci odrůd (Mailer *et al.*, 1994) nebo při kontrole odrůdové čistoty u hybridních odrůd (Marshall *et al.*, 1994).

**RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) analýza byla prvním molekulárně markerovacím systémem a uplatnila se při určování zákonitostí polymorfismů DNA uvnitř čeledi brukvovitých ale i mezi jejími jednotlivými zástupci (Figdore *et al.*, 1988; Dos Santos *et al.*, 1994; Halldén *et al.*, 1994; Boyes *et al.*, 1997). Nicméně celý proces probíhá v laboratoři a je velmi náročný na finance i přístrojové vybavení laboratoře, a proto je jen málo míst, kde se tyto analýzy v současnosti provádí.

Novější DNA markery založené na PCR technologii (Mullis, 1994), která je jednodušší, rychlejší a nevyžaduje takové množství vysoce kvalitní DNA, jsou již často využívány pro rutinní určování odrůd (Fisher *et al.*, 1996; Snowdon, 2004).

Jednou z prvních metod, používaných pro identifikaci a rozlišení odrůd řepky byla technika RAPD markerů. **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA), tato metoda dovoluje použít široké spektrum markerů, zejména při testování PCR reakce s větším počtem oligonukleotidových primerů s libovolnou sekvencí (Williams *et al.*, 1990). Velkou výhodou RAPD je jejich jednoduchost, rychlost, potřeba malého množství genomické DNA a testování může probíhat i bez přechozí znalosti sekvence (Micheli *et al.*, 1994). RAPD analýzy byly široce využívány ke zjišťování polymorfismů u různých druhů brukvovitých (Jain *et al.*, 1994; Kresovich *et al.*, 1992; Mailer *et al.*, 1994; Javidfar *et al.*, 2006). Úroveň genetického rozlišení RAPD markerů je ekvivalentní RFLP při určení genetických příbuzných vztahů mezi liniemi *Brassica oleracea* L. a *B. napus* L. (Dos Santos *et al.*, 1994; Halldén *et al.*, 1994). RAPD markery byly úspěšně používány v genetickém fingerprintingu, při analýze odrůd různých druhů rodu *Brassica*, ale i mezi nimi samými (Demeke *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1994). Dále jsou využitelné při analýze původů (Scott *et al.*, 1992; Lerceteau *et al.*, 1997) a genetickém mapování (Reiter *et al.*, 1992; Uzunova *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2002), odrůdové identifikaci a detekci genetické čistoty hybridních odrůd (Delourme *et al.*, 1994, 1998; Ilbi, 2003), identifikaci alel pro autoinkompatibilitu a detekci skrytých S alel (Delourme *et al.*, 1995; Pomper *et al.*, 1998) dále při analýzách rostlin s různým složením oleje (Hu *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2002; Javidfar *et al.*, 2006). Nevýhodami RAPD metody je jejich malá opakovatelnost, nízká reprodukovatelnost výsledků, ale i dominantní charakter markeru, proto se využívají i další metody molekulárního markerování, jako jsou např. mikrosatelity (SSR).

Mikrosatelity a techniky **SSR** (Simple Sequence Repeats) jsou kodominantní markery založené na vysoké úrovni polymorfismu (Grist *et al.*, 1993; Morgante a Olivieri, 1993; Charters *et al.*, 1996; Cardle *et al.*, 2000; Lydiate a Sharpe 2003), řídicí se jednoduchou Mendelistickou dědivostí, také konzervativností pro úzce příbuzné druhy (Pilinsky *et al.*,

2011) a očekává se od nich vyšší odlišovací schopnost odrůd (Chevre *et al.*, 1991). Ačkoliv je vývoj místně specifických oligonukleotidových primerů velmi zdoluhavý a finančně náročný, byla objevena řada specifických primerových párů. Velmi ceněné byly tyto vzniklé páry primerů při identifikaci jednotlivých odrůd (Kresovich *et al.*, 1995; Szewc-McFadden *et al.*, 1996; Uzunova a Ecke, 1999; Tommasini *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2004).

Další alternativou molekulárního markerování může být metoda **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism). AFLP analýza je technika, pomocí níž jsou amplifikovány specifické fragmenty z celkového množství DNA (Vos *et al.*, 1995) a v identifikaci odrůd se ukazuje být naprosto přelomovou technikou (Powell *et al.*, 1996). Poskytuje široké spektrum markerů (použitých v jednoduchých reakcích) bez předchozí znalosti sekvence (Vos *et al.*, 1995). Technika AFLP je úspěšně aplikována i pro zjišťování vnitrodruhové a mezidruhové genetické diverzity (Weising *et al.*, 2005). V porovnání s metodou RFLP, která poskytuje nízkou úroveň polymorfismu mezi odrůdami (Diers a Osborn, 1994), je AFLP velmi žádanou kvalitativní metodou pro identifikaci odrůd (Čurn *et al.*, 2002), a to i pro doplnění DUS testů prováděných na řepce. Výsledky AFLP analýz, jakožto nástroje pro identifikaci odrůd řepky, jsou jedny z nejžádanějších v porovnání s dalšími dostupnými technikami (Das *et al.*, 1999; Lombard *et al.*, 2000). Díky specifikům AFLP analýzy poskytuje tato metoda vysoký multiplexor koeficient, který je určený poměrem počtu informačních bodů na experiment (Powell *et al.*, 1996). AFLP markery se mohou využívat i při testování Rf genů u dominantní genetické pylové sterility (Hong *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

**PCR-RFLP** (CAPS) metoda zjišťuje sekvenční polymorfismus PCR fragmentů (Konieczny a Ausubel, 1993). Udává možnosti rozlišení různých alel jednoho genu nebo i nekódujících úseků, které se mohou využívat jako marker. Princip metody spočívá v PCR amplifikaci specifického fragmentu DNA, který se štěpí restriční endonukleázou, a následně jsou vyhodnocovány délky vzniklých fragmentů. Rozpoznávací místo pro restriční endonukleázu by se mělo nacházet v odlišné nukleotidové sekvenci tak, aby se od sebe oddělily dva úseky DNA, lišící se byť jen v jediné bázi. Cílem je dosažení maximální úrovně polymorfismu. Vznikají fragmenty různé délky, které jsou separovány na agarosovém gelu a vizualizovány. Postupně se využívá několik endonukleáz, aby bylo možné dosáhnout, co

nejvyšší míry a spolehlivosti odlišení. Výhodou metody je přesné zjištění místa mutace, ale i její relativní finanční a časová nenáročnost. Nevýhodou může být relativně nízká detekce mutací závislá na počtu použitých restričních enzymů (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997). PCR–RFLP je další metodou, která poskytuje dostatečný polymorfismus a je možné její využívání při studiu diverzity v rámci čeledí např. brukvovitých, ale je využitelná i při studiu jednotlivých genů a hledání jejich alel, poznávání starých nebo hledání nových alel. V hybridním šlechtění se využívá této metody při hledání obnovitelů fertility a udržitelů sterility (Zhang *et al.*, 2008).

Slučování výsledků jednotlivých metod použitých při markerování poskytuje potřebné informace pro tvorbu molekulárních map (Foisset *et al.*, 1996).

## **6. Charakteristika systémů zabraňujících opylování**

V současné době je nejvýznamnějším způsobem šlechtění hybridní, ruční kastrace je velmi pracná a při současném množství materiálů téměř nemyslitelná, jsou používány systémy, které jí plně nahrazují.

### **Mechanismy řízeného opylování**

U řepky olejné se využívá několika systémů zabraňujících samosprášení a to jaderné samčí sterility (GMS), genově-cytoplasmatické formy pylové sterility, cytoplasmatické formy samčí sterility (CMS) a autoinkompatibility (Ondřej a Drobník, 2002).

#### **Genetika pylové sterility a její využití ve šlechtění řepky**

Pylová sterilita se projevuje nejčastěji deformací prašníků až jejich zakrněním, někdy je jejím projevem také neživotný pyl.

#### **Jaderná samčí sterilita**

Jaderná samčí sterilita je zpravidla recesivní a je sporofytického typu. Linie s pylovou sterilitou, homozygotní pro recesivní gen, se udržují křížením pylově sterilních rostlin s fertálními (Ondřej a Drobník 2002). Polovina rostlin je pak pylově sterilní, druhou polovinu tvoří heterozygoti, které je nutné, ale velmi složité, z mateřských linií odstranit (Tu *et al.*, 1999).

#### **Transgenní pylová sterilita**

Jaderná samčí sterilita může být navozena také pomocí genového inženýrství vnesením transgenu. Pylová sterilita podmíněná transgenozí je rovněž sporofytického typu,

ale je oproti přirozené dominantní. U řepky je tento systém představován systémem barnáza – barstar. Barnáza je extracelulární RNáza z bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*. Využívá se zde kódující sekvence genu pro barnázu, řízené promotorem specifickým pro tapetum. Tapetum obklopuje pylový váček, v němž jsou pylové mateřské buňky a později vyvíjející se pylová zrna. Tapetum později degraduje. V době, kdy jsou vyvinuta zralá pylová zrna, tedy tapetum už v prašníku není. Tapetum produkuje řadu proteinů, které buď napomáhají vývoji pylu, nebo se stávají komponentami vnějších stěn pylových zrn. Protože byla zjištěna tato důležitost tapeta při vývoji pylových zrn. Byl zvolen jako promotor (nazvaný TA29) pro gen barnázu. A tento gen pak podmiňuje úplnou pylovou sterilitu rostliny. V následující generaci je však nutné sterilitu odstranit, což zajišťuje gen barstar, se stejným promotorem jako barnáza, neboť je specifickým inhibítozem barnázy. Mateřská transgenní linie obsahuje transgen barnázu vytvářející pylovou sterilitu a otcovská transgenní linie obsahuje transgen barstar obnovující pylovou fertilitu. Po zkřížení těchto dvou transgenních linií, vzniká pylově fertilní heterozygot (Ondřej a Drobník 2002).

#### **Genově - cytoplasmatická sterilita**

Genově - cytoplasmatický typ pylové sterility je podmíněný účinkem specifických jaderných genů (rfrf) přítomných v „S“(sterilním) typu cytoplasmu. Např. MSL (Male Sterility Lembeke) – je systém samčí sterility nalezený jako spontánní mutace v německé firmě Norddeutsche Pflanzenzucht v roce 1982 (Frauen a Paulmann 1999). Tento systém se skládá ze tří komponentů (Noack *et al.*1999):

- a) sterilní mateřská linie produkující posléze hybridní osivo
- b) fertilní udržovatel sterility sloužící k namnožení sterilní mateřské linie
- c) obnovitel pylové fertility využívaný jako otcovská odrůda

#### **Cytoplasmatická sterilita**

Cytoplasmatických typů pylové sterility se u řepky vyskytuje několik, které mají původ ve vnitrodruhovém i mezidruhovém křížení, případně ve spontánní mutaci. V literatuře je popsáno 7 typů. Nejvýznamnější jsou však 4 typy:

**CMS nap** – nejznámější je tzv. systém „Bronowski“, který pochází z křížení odrůd ozimé a jarní řepky s polskou odrůdou „Bronowski“. Sterilitu pylu kontrolují dva jaderné geny (*rflrf1*, *rf2rf2*). Systém je však nestálý, podléhá vlivu teploty vzduchu. Byl poprvé popsán Thompsonem v roce 1972, stejný typ objevili Shiga a Obkawa. Někdy je proto tento systém nazýván též Shiga – Thompson (Bartkoviak – Broda, 1991). Podobný je svým projevem a nestálostí typ CMS *cam*, označovaný také jako „japonský“, pocházející z druhu *B. campestris*. Je geneticky shodný s prvním typem a souvisí s genomem BB.

**CMS pol** – objevený v populaci jarní řepky „Polima“, který je geneticky podmíněný genotypem *rfrf*. Jsou známy i obnovitelé s *Rf* geny. Je méně stabilní. (Barsby *et al.*, 1987)

**CMS jun** – pochází z kolekce odrůd druhu *B. juncea*, vyznačuje se vysokou stabilitou a možností obnovy fertility.

**CMS ogu** – pochází z japonské ředkve druhu *Raphanus sativus* (Ogura, 1968).

Do řepky byla přenesena mezirodovým křížením po přenosu jádra druhu *B. oleracea* do cytoplasmy druhu *Raphanus sativus*.

V Německu byla popsána pylově sterilní linie řepky vybraná z polské odrůdy „Jampol“. Tento typ je kontrolován dominantním genem *Msj* a je poměrně stabilní i v rozdílných podmínkách. V Číně byly nalezeny zdroje pylové sterility ve starých krajových odrůdách a jsou využívány k produkci dvouliniových hybridů.

V praktickém využití CMS nastává i nadále problém vhodných udržovatelů sterility a hlavně získání účinných obnovitelů fertility s *Rf* geny, bez negativního ovlivnění dalších znaků a vlastností (Bartkoviak – Broda *et al.*, 1991).

### **Autoinkompatibilita**

Autoinkompatibilita (AI) byla u řepky popsána Olsonem v roce 1953, jako úplná inhibice vývinu pylových láček při samoopylení rostlin. Autoinkompatibilita je jeden ze systémů, kterými se rostlina brání oplození vlastním pylem. Je to pro ni výhodné, protože se tak chrání před inbrední depresí, vznikající po samosprášení a při opakujícím se inbreedingu

(samosprašení nebo opylení velmi příbuznými jedinci). Většina systémů autokompatibility je pod kontrolou jednoho mnohoalelového S-locusu (s výjimkou čeledi *Poaceae*, kde jsou lokusy dva S a Z). Dvě genetické formy AI jsou identifikovány na základě fenotypu pylových zrn. Tento fenotyp je určen svým vlastním haploidním genomem (gametofytický typ) nebo pomocí diploidního genomu mateřské rostliny (sporofytický typ). Gametofytická AI je charakteristická pro čeledi: *Solanaceae* (lilkovité), *Scrophulariaceae* (krtičníkovité), *Rosaceae* (růžovité), *Papaveraceae* (mákovité) a *Poaceae* (lipnicovité). Sporofytická AI je charakteristická pro čeledi: *Brassicaceae* (brukvovité) a *Asteraceae* (hvězdnicovité) (Hiscock *et al.*, 1993).

Podstatou AI reakce je schopnost rostliny zabránit oplození vajíček v semeníku svým vlastním pylem. Tato jedinečná vlastnost rostliny byla dříve v liniovém šlechtění opomíjena až zatracována. Autoinkompatibilní rostlina je totiž taková, u které nemůže za normálních podmínek dojít k oplození vlastním pylem (de Nettancourt, 1977). Tato vlastnost se pro liniové šlechtění nehodila a vymizela postupným výběrem rostlin pro tento vhodných způsob šlechtění. Zatímco v hybridním šlechtění by se významně uplatnila, a proto se začaly cíleně hledat její nové zdroje jednak mezi staršími odrůdami, ale i její nové mutace v sortimentu současných odrůd (Sobotka *et al.*, 2000).

AI se může rozčlenit na dva typy na heteromorfní a homomorfní. Pro první typ je charakteristická nestejná délka pestíku a tyčinek (heterostilie), kdy je fyzicky nemožné, aby se pyl dostal na bliznu. Zatímco u homomorfního typu je pyl sice přenesen na bliznu, ale je mu znemožněna schopnost klíčit, protože pylové zrno není bliznou hydratováno, anebo dokonce i vyklíčí v důsledku vyšší vzdušné vlhkosti, ale dochází k blokaci růstu pylové láčky, a ta neproroste až do semeníku k vajíčkům (Dickinson, 1995; Brugiere *et al.*, 2000). Tento typ se následně dělí na sporofytickou a gametofytickou AI. U gametofytické je AI fenotyp pylového zrna určen vlastním haploidním genotypem, zatímco u sporofytické je chování pylového zrna závislé na diploidním genotypu rodičovské rostliny (de Nettancourt, 1977).

U rodu *Brassica* je tento systém kontrolován multialelickým lokusem (S lokusem). Ten odpovídá za reakci mezi pylem a buňkami blizny. Při gametofytické AI je klíčení pylového zrna na blizně závislé na vlastním genotypu pylového zrna, nicméně při sporofytickém typu AI je klíčení závislé na S alelách obsažených v DNA pestíku akceptorové rostliny, na které klíčí pylové zrno. Tento typ AI je poměrně komplikovaný a to i z důvodu

výskytu tzv. modifikačních genů (Ekuere *et al.*, 2004). U diploidních druhů rodu *Brassicaceae* (*B. oleracea*, *B. rapa*) se autoinkompatibilita vyskytuje poměrně hojně. Naproti tomu řepka olejná, vyskytující se jako allotetraploidní druh, je autokompatibilní (Okamoto *et al.*, 2007), i když jsou známy zdroje AI i u *Brassica napus* (Gowers *et al.*, 1989; Havel *et al.*, 1996). Zajímavé ale je, že při pokusech o resyntézu z rodičovských druhů je výsledný potomek opět autoinkompatibilní (Beshorner *et al.*, 1995; Rahman *et al.*, 2005). Při opylení rostliny řepky dochází nejprve k rozpoznání S fenotypu pylového zrna. Při identifikaci téže S alely, která se vyskytuje v rodičovském páru, se stimuluje proces, který přímo vede k odmítnutí pylu. Rozpoznávací systém u brukvovitých je kontrolován jednoduchým mendelistickým lokusem nesoucím více než 80 S alel (de Nettancourt, 1977; Brace *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1993; Brugiére *et al.*, 2000). Na S-lokusu byly identifikovány asi dvě desítky genů, které kosegregují přesně s AI fenotypem (Boyes *et al.*, 1997; Casselman *et al.*, 2000).

### **Charakteristika S-lokusu**

Při hledání genetického založení autoinkompatibility, se zjistilo, že je kontrolována S lokusem, který má velký počet alel (Ockendon, 1974; De Nettancourt, 1977).

V literatuře je S lokus popsán také u celé řady druhů rostlin, např. u rodu *Iberis* se nachází 22 alel (Bateman, 1955), 34 u rodu *Raphanus* (Sampson, 1957), 50 u druhu *Brassica oleracea* (Brace *et al.*, 1994), 30 u druhu *Brassica campestris* a u druhu *Brassica napus* je detekováno 50 alel (Nou *et al.*, 1993). Jednotlivé alely, tohoto lokusu, nazývané též S-alely, byly podle svého účinku rozděleny na I a II třídu. Předpokládá se, že třída I je dominantní nad třídou II (Nasrallah *et al.*, 1991).

Jednotlivé alely, tohoto lokusu, nazývané též S-alely, byly podle svého účinku rozděleny na dvě třídy I a II. Předpokládá se, že třída I je dominantní nad třídou II. (Nasrallah *et al.*, 1991).

Bylo objeveno, že S lokus u druhu *Brassica oleracea* L. se skládá asi z 200 kb DNA. Při následném bližším studiu tohoto lokusu se zjistilo, že na něm leží 2 významné geny *SLG* a *SRK* (Hiscock *et al.*, 1995). Gen *SLG* (S locus glycoprotein) – kóduje sekreci glykoproteinu,



který je lokalizován primárně v buněčné stěně pokožkových buněk blizny. Gen *SRK* (*S* receptor kinase) – kóduje transmembránový receptor serin-threonin kinázu, který překlenuje plazmovou membránu papily na blizně. Tyto dva geny jsou považovány za geny, které se podílí na schopnosti blizny rozeznat příbuzný a nepříbuzný pyl. Oba geny jsou vysoce polymorfní a jejich exprese byla zjištěna pouze na povrchu zralých blizen (Sato *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1991). Později byl objeven i další gen *S*-lokusu spojovaný s AI reakcí gen *SCR* (*S*-lokus cystein rich protein) – syn. *SP11* (Suzuki *et al.*, 1999), nazývaný též samčí determinant, protože se projevuje pouze v prašnicích, kde se v buňkách tapeta vytváří protein, který se váže na protein genu *SLG* bez ohledu na *S*-haplotyp. Gen *SCR* je v genové vazbě s geny *SLG* a *SRK* (Schopfer *et al.*, 1999). U druhu *Brassica napus* L. bylo zjištěno, že se gen *SCR* exprimuje převážně v buňkách tapeta homozygotů třídy II, zatímco u heterozygotů třídy I a II je exprese třídy II potlačena (Shiba *et al.*, 2002). Podobné alely genu *SCR* třídy I jako u rodu *Brassica* byly objeveny u rodu *Raphanus* (Okamoto *et al.*, 2004).

Alely genů *SLG* a *SRK* třídy II mají z fylogenetického hlediska odlišný původ než alely třídy I (Hinata *et al.*, 1995; Kusaba *et al.*, 1997). Obdobné pozorování bylo provedeno i u alely genu *SCR* (Shiba *et al.*, 2002). Při mezidruhovém křížení druhů *Brassica rapa* a *Brassica oleracea* se na pozadí druhu *Brassica napus* jevíly *S*-alely druhu *Brassica oleracea* jako dominantní (Ripley a Beversdorf, 2003).

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

Specifita je v AI reakci určena alelově specifickou interakcí mezi *SRK* receptorem a *SCR* ligandem. Z toho vyplývá, že geny *SRK* a *SCR* se musí vyvíjet zároveň, aby se udržela jejich vzájemná interakce (Chookajorn *et al.*, 2004). Statisticky bylo prokázáno, že geny *SCR/SP11* a *SRK* jednoho *S*-haplotypu u druhů *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* se odchyľují souběžně (Sato *et al.*, 2002).

## 7. Markerování rostlin s nízkým obsahem kyseliny linolenové

Řepka je naší nejdůležitější olejninou její olej se využívá jednak pro potravinářské účely ale i jako surovina pro výrobu metyl esterů (MERO) významného aditiva do nafty a bionafty (Baranyk, 2007).

Vhodnost řepkového oleje pro potravinářské zpracování je dána jeho složením. Olej běžných odrůd bezerukových řepok obsahuje 40 – 60 % kyseliny olejové (18:1), 20 – 40 % kyseliny linolové (18:2) a kolem 10 % kyseliny linolenové (18:3). Relativně velmi vysoký podíl linolenové kyseliny je negativní. Díky snadné oxidaci dvojných vazeb dochází ke snížení stability sensorických vlastností a znehodnocení výsledných produktů (margaríny, oleje) (Röbbelen a Nitsch, 1975). Z tohoto důvodu byl vznesen požadavek ze strany zpracovatelů oleje na snížení jejího obsahu na minimum, stejně jako tomu bylo s kyselinou erukovou. Ale došlo ke střetu zájmu zpracovatelů s lékařským výzkumem, neboť kyselina linolenová patří mezi humánní esenciální mastné kyseliny a je tudíž nezbytná a nenahraditelná v lidské výživě. Je prekurzorem pro důležité látky v lidském těle jako jsou eikosanoidy obsažené v imunitním a vaskulárním systému (thromboxane, leukotriene), dále pro prostaglandiny a růstové faktory (Fossati *et al.*, 1994). Maximální obsah kyseliny linolenové v řepkovém oleji pro lidskou výživu by měl být okolo 3 % (Scarth *et al.*, 1988).

Tato mastná kyselina má významnou roli i uvnitř rostliny, a proto je její úplná eliminace z řepky nemožná, např. je nezbytná při fotosyntéze (Hughly *et al.*, 1989) a při správném vývoji pylových zrn (McConn a Browse, 1996).

Snížení obsahu kyseliny linolenové prostou selekcí se ukázalo jako neproveditelné, jelikož nebylo známo genetické založení tohoto znaku a fenotypový projev byl často ovlivňován faktory prostředí. Prvního úspěchu dosáhli Röbbelen a Nitsch (1975), jimž se podařilo chemickou mutagenézí vytvořit mutantní linii M11 z kanadské odrůdy Oro. Z této linie byla dále vytvořena selekcí jarní odrůda řepky Stellar se sníženým obsahem kyseliny linolenové 3 %.

Na obsahu kyseliny linolenové se podílí hlavně genotyp embrya respektive interakce dvou až tří lokusů (Chen a Beversdorf, 1990). Podstata genetické regulace znaku je složitá, je řízena matroklinně a je ovlivňována teplotou (Pleines a Friedt, 1989; Diepenbrock a Wilson, 1987). Za syntézu kyseliny linolenové zodpovídají geny pro desaturázy, které vytváří dvojné

vazby. V semeni je to gen *fad3* (Lemieux *et al.*, 1990) a v zelených částech rostliny, respektive v plastidech, jsou to pak geny *fad7* (Browse *et al.*, 1986) a *fad8* (Gibson *et al.*, 1994).

Předpokládá se, že geny *fad3* i *fad7* mají 6 – 8 kopií v haploidním genomu. Duplikována je celá velká multigenní rodina desaturáz a zdá se, že je to výsledek duplikace velkého úseku chromozomů než jednotlivých genů. Podle počtu kopií u druhů *Brassica rapa* a *Brassica oleracea*, které jsou původními předky druhu *Brassica napus*, se dá usuzovat, že duplikace pravděpodobně vznikla již mnohem dříve v některém rodičovském druhu (Scheffler *et al.*, 1997).

Markery, pro šlechtění řepky na pozměněný obsah kyseliny linolenové, byly publikovány (např. Hu *et al.*, 1995, 1999; Jourden *et al.*, 1996; Rajcan *et al.*, 1999; Somers *et al.*, 1998; Tanhuanpää *et al.*, 1995; Thormann *et al.*, 1996). Tito autoři použili markery RAPD (*random-amplified polymorphic DNA*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) a SCAR (*sequence-characterized amplified region*). Alelově specifické markery jsou nejpřesnější a nejužitečnější, protože jsou situovány přímo ve sledovaném genu (Tanhuanpää *et al.*, 2002).

Genetické pozadí řepok v citovaných publikacích je odlišné od genetického pozadí domácích odrůd řepky. Vzhledem k tomu, že tyto markery jsou nestabilní v různém genetickém pozadí, je potřeba jejich použití při analýzách domácích genotypů ověřit a případně navrhnout vhodné postupy pro vývoj vlastních markerů a jejich využití (viz tab.3).

Tab. č. 3. Šlechtitelský pokrok ve šlechtění řepky olejné za posledních 30. let (Koprna, 2006; upraveno podle Vašáka *et al.*, 1997)

Období (přibližně)	Charakteristika odrůd	Využití
do 1975	"EG" odrůdy s nevyhovující kvalitou vysoký obsah k. erukové KE v oleji a vysoký obsah glukosinolátů GSL ve šrotu	malé možnosti využití oleje, hlavně pro technické účely
1975 - 1985	tzv. "0" odrůdy se sníženým obsahem KE do 5%, ale vysokým obsahem GSL	rozšíření použití pro potravinářské použití, bez krmivářského využití, zvýšení osevních ploch
1985 až současnost	"00" odrůdy s minimálním obsahem KE a nízkým obsahem GSL (do 30 umol g semen)	bezproblémové potravinářské využití přidávání šrotů a výlisků do krmných směsí, zvýšení osevních ploch
1995 až současnost	rozšíření hybridních odrůd (nejdříve na bázi MSL Lembke, později <i>Ogu/INRA</i> )	stejně použití jako "00" odrůdy, využití heteroze ke zvýšení výnosu
2000 až současnost	výkonné liniové odrůdy s velmi nízkým obsahem GSL, nové trendy - změněná skladba mastných kyselin v oleji, žlutosemenné odrůdy, trpasličí odrůdy, využití GMO technologií	další nárůst osevních ploch, šlechtění odrůd se "speciálním složením" olejů, potravinářské účely, MEŘO pro výrobu bionafty, tolerance k herbicidům, odolnost chorobám a škůdcům, mrazuvzdornost

## 5. Materiál

Jako testovací materiál byly použity linie a šlechtitelské materiály AI a AK rostlin a dále rostlin zkoušených na obsah kyseliny linolenové, pocházející z VÚOL v Opavě, dále vybrané československé a české odrůdy z období let 1946-2007 a vybrané německé odrůdy.

### 1. Soubor dihaploidních šlechtitelských materiálů

Analýzy byly prováděny na skupinách rostlin pocházejících z křížení Tandem 6/85 x donor kvality oleje OP 2051 (jarní řepka) (viz tab.č.4). V potomstvu byly nalezeny dvě AI rostliny AIK3 a AIK6, které se staly základem pro dvě dihaploidní linie. Ty linie byly použity pro další kvalitativní křížení s některými výnosnými odrůdami (Rasmus) a šlechtitelskými materiály (OP BN 03, OP -571/00) s dobrou kvalitou oleje (Koprna, 2005). Do testu bylo použito 122 dihaploidních rostlin odvozených z F1 potomstva po křížení donorů AI jedinců, které byly poskytnuty z VÚRV Praha Ruzyně. (Tento soubor rostlin byl použit pro vyhledávání AI rostlin v souboru speciálních šlechtitelských linií v rámci řešení prvního okruhu).

Tab. č. 4: Schéma vzniku testovaného souboru odrůd postupným křížením AI rostlin a donorů kvality.

					AIK 6 x Rasmus	(53 rostlin)
					AIK 6 x OP BN 03	(46 rostlin)
	Tandem 6/85 x OP 2051	=	AIK3, AIK6	----- -----		
					AIK 3 x OP- 571/00	(23 rostlin)

### 2. Soubor českých a československých odrůd

Staré krajové, 0, 00 a moderní odrůdy (od každé odrůdy 10 rostlin). Čísla v závorce za každou odrůdou značí zjednodušenou identifikaci vzorků uváděnou u fotografií a ve

výsledcích, číslo za / je číslo rostliny). Tento soubor rostlin byl použit v rámci řešení druhého a třetího řešeného okruhu.

#### Československé a české odrůdy:

Třebíčská (1), Přerovská (2), Slapská (3), Česká Krajová (4), Valečovská (5), Slovenská Krajová (6), Mira (7), Solida (8), Silesia (9), Sonáta (10), Aglona (11), Omikron (12), Slapská Stela (13), Odila (14), Oponent (15), Opus (16)

#### České a československé odrůdy:

Třebíčská	nemáme údaje o původu, registrace 1941
Přerovská	nemáme údaje o původu
Slapská	nemáme údaje o původu, registrace 1946
Česká krajová (jarní)	nemáme údaje o původu, registrace 1949
Valečovská (jarní)	nemáme údaje o původu
Slovenská krajová	nemáme údaje o původu
Mira	(Dipee(Oerlikon) x Weilbulls 541) x Vuindeok, registrace 1978
Solida	1129/75, 3981, BNW17(NDR), KM2 – náhled. Výběr, registrace 1986
Silesia	kanad. jar. řepka s min. obsahem kys.erukové (x KII.) x CB, registrace 1983
Sonáta	(Bronowski x Zero) x K 2040, registrace 1990
Aglona	(Okega x Ledos) x Solux, opakovaný výběr, registrace 1993
Omikron	OKE-2 (křížení kanadské jarní řepky bezerukové s n.šl.K II. a CB, opakovaný individuální výběr, n.šl.

Slapská Stela (Jet Neuf x PNG-14), registrace 1996

Odila (Darmor x R1) x Ceres, Opakovaný výběr, registrace 1997

Oponent (OP-855 x OP-934) x Lirajet, pylově fertilní linie, registrace 2006

Opus OP 1412 x Aztec, pylově fertilní linie, registrace 2007

### **3. Soubor německých odrůd**

Soubor řepok německé proveniencí odpovídající průřezu německým šlechtěním - zastoupené jsou jak staré odrůdy, tak moderní i postmoderní odrůdy. Tento soubor rostlin byl použit v rámci řešení druhého a třetího řešeného okruhu.

Německé odrůdy:

Rechtbergrs Winterraps (17), Olquel (18), WRG 19 (19), Falcon (20), Zorro (21), Rasmus (22), Orkan (23), Pilot (24), Ramiro (25), Smart (26), Trend (27), Digger (28), Siska (29), Winner (30), Petra (31), Senator (32).

**Německé odrůdy:**

Rechtbergrs winterraps nemá údaje o původu

Olquel nemá údaje o původu

WRG 19 nemá údaje o původu

Falcon Ledos x (Rapol x Hector) x Jet Neuf, křížení, registrace 1993

Zorro (Bienvenue x Chr. 1775) x (Darmor x NPZ 2/84), pedigree m. reg. 1997

Rasmus cross 6 rod., zúžená populace, pedigree selekce, registrace 2000

Orkan	(Inca x Darmor), pedigree metoda, registrace 1998
Pilot	PHP 43921 x Ni 18/92, pedigree, pyl. fert. linie, reg. 2001
Ramiro	(89508 x RG 15) X (Valesca x St. 22/92), pyl. fert. linie, reg. 2002
Smart	Apex x 88/18888 Hilleshög, pedigree, zúžená populace, registrace 2005
Trend (jarní)	zúžená populace, IRIS x SPONSOR, pedigree, registrace 2005
Digger	materiál firmy KWS, zúžená populace, registrace 2006
Siska	Falcon x Apex, izolované udržování a množení, registrace 2006
Winner	PHP 92512 x Falkon, double haploid, registrace 2006
Petra	Amor x St. 140.180, izolace, registrace 2007
Senator (jarní)	[(Drakkar x Niklas) x Korall], pedigree, zúžená populace, reg. 2005

(Původ odrůd je získaný od Ing. Zehnáka z ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou)

#### **4. Soubor experimentálních materiálů pro testování markeru pro obsah kyseliny linolenové**

Soubor dvanácti testovaných skupin rostlin, vzniklých na základě jednotlivých kombinací křížení. Rodičovské dvojice tvořil šlechtitelský materiál nesoucí nízký obsah kyseliny OP-904 nebo OP-1006 na straně jedné a na straně druhé byla výnosná odrůda (Winner) nebo výnosný šlechtitelský materiál (OP-BN-07, OP-BN-09, OP-BN-12, OP-BN-13, OP-1013).

OP-BN-07 x OP-1006 , F1, A1



OP-BN-07 x OP-904, F1, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10.

OP-BN-09 x OP- 904, F1, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10.

OP-1006 x Winner, F1, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8.

OP-1006 x OP-BN-09, F1, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11.

OP-1006 x OP-BN-12, F1, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12.

OP-1006 x OP-BN-13, F1, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7.

OP-1006 x OP-1013, F1, I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10, I11, I12, I13

OP-904 x Winner, F1, J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9.

OP-904 x OP-BN-09, F1, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8.

OP-904 x OP-BN-13, F1, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10.

OP-904 x OP-1013, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8.

Tento soubor rostlin byl použit v rámci řešení čtvrtého okruhu.

## 6. Metody

### 1. Příprava vzorků k testování

První odběr rostlinného materiálu byl proveden na semenáčcích, kdy byla odebírána část děložního listu. Po 6 týdnech pěstování ve skleníku byly rostliny odvezeny na jarovizaci do chladových boxů do VÚRV Praha Ruzyně. Po jarovizaci byly rostliny ve skleníku dopěstovány do květu. Z nerozvitých pupat asi 1-2 dny před rozvitím, kdy je nejvyšší obsah glykoproteinu v papilárních buňkách blizny (Kandasamy *et al.*, 1989), byly postupně odebírány prašníky a blizny a dále i listy, všechny odebrané části byly ihned zmražovány v tekutém dusíku, aby nedocházelo k degradaci RNA.

### 2. Izolace DNA

Byly použity dva způsoby izolace DNA jednotlivých rostlin. Pro řešení cílů 1 a 4 byla izolována izolačním kitem Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex) a pro řešení cílů 2 a 3 metodou CTAB PVP (Čurn *et al.*, 2008).

### 3. Izolace RNA, mRNA

Z prašníků, blizen a listů vybraných rostlin byla izolována celková RNA (RNeasy PLANT Mini Kit, Qiagen), z ní posléze mRNA (Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen).

### 4. PCR reakce

Do reakcí byl použit specifický pár primerů korespondující s regionem DNA a odpovídající alele genu *SLG I* PS5 (5' - ATGAAAGGCGTAAGAAAAACCTA- 3') a PS15 (5' - CCGTGTATTATTTAAGAGAAAGAGCT - 3') (Nishio *et al.*, 1996), zodpovědný za syntézu fragmentu o velikosti přibližně 1300 bp.

Do PCR bylo použito 25ng genomické DNA jako templát, celkový obsah vzorku činil 25  $\mu$ l, Master Mix 12,5  $\mu$ l (PPP Master Mix, Top-Bio), H<sub>2</sub>O 11  $\mu$ l, primery PS5+PS15 0,25+0,25  $\mu$ l (10 pM), DNA 1  $\mu$ l. K PCR byl použit thermocycler Bioer XP.

Teplotní profil:

počáteční denaturace

94°C 5min,

35 cyklů	denaturace	93°C	1min,
	annealing	58°C	2min,
	elongace	72°C	3min
	finální elongace	72°C	10 min.

PCR produkty byly separovány na 1,5% agarosovém gelu při napětí 80V, jako velikostní a hmotnostní marker byl použit 100bp ladder (NEB). Vizualizace probíhala pod UV světlem pomocí Sybr Green. Byla hodnocena přítomnost/nepřítomnost fragmentů o velikosti 1300kb.

## 5. RT PCR

Reverzní transkripce a tvorba cDNA byla provedena (RT PCR Capacity cDNA RT Reverse transcription Kit, Applied Biosystems): 10x RT Buffer 2  $\mu$ l, 25x DNTP's mix 0,8  $\mu$ l, 10x primery 2  $\mu$ l, reverse transcriptase 1  $\mu$ l, RNase inhibitor 1  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 3,2  $\mu$ l, templát mRNA 10  $\mu$ l.

Cyklus na termocykleru:	10 min	25°C
	120 min	37°C
	5 s	85°C
	60 min	4°C

## 6. PCR - RFLP

Do reakce byly použity primery PS5 a PS15 (Nishio *et al.*, 1996).

Pro PCR bylo použito 25ng genomické DNA jako templát, celkový obsah vzorku činil 25  $\mu$ l, Master Mix 12,5  $\mu$ l (PPP Master Mix, Top-Bio, H<sub>2</sub>O 11  $\mu$ l, primery PS5+PS15 0,25 + 0,25  $\mu$ l (10 pM), templátové DNA 1  $\mu$ l (25ng). Typ thermocykleru a cyklus stejný jako v případě 5.4. Následovalo restriční štěpení, do kterého bylo použito:

- a) 5  $\mu$ l PCR produktu, 1  $\mu$ l pufru, 0,25  $\mu$ l *Eco*R1 (5U), 3,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

- b) 5 µl PCR produktu, 1 µl pufru, 0,25 µl *MseI* (5U), 3,75 µl H<sub>2</sub>O.
- c) 5 µl PCR produktu, 1 µl pufru, 1 µl BSA, 0,5 µl *Afa I* (5U), 2,5 µl H<sub>2</sub>O.
- d) 5 µl PCR produktu, 1 µl pufru, 0,5 µl *Hind III* (5U), 3,5 µl H<sub>2</sub>O
- e) 5 µl PCR produktu, 1 µl pufru, 1 µl *MboI* (5U), 3 µl H<sub>2</sub>O.

Inkubace 4 hodiny při 37°C. Barvení, separace na 1,5% agarosovém gelu při napětí 80 V a vizualizace pod UV světlem.

## 7. AFLP

Byla použita DNA vyizolovaná při pokusu č. 2, upravená (přečištěná, zředěná) pro metodu AFLP. Pro AFLP analýzu byla vybrána dvojice primerů *MseI* ACC a fluorescenčně značený primer. *EcoRI* ACG.

AFLP reakce měla následující kroky: restrikce genomické DNA a ligace adaptorů

**Restrikce** (50 µl celkový objem):

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

Na 1 vzorek: 4 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *MseI* = 5 U

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

**Ligace** (60 µl celkový objem):

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

Na 1 vzorek: 1  $\mu$ l 10x RL pufu, 0,1  $\mu$ l *EcoRI*-3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 $\mu$ l *EcoRI*-5' adaptoru = 5 pmol, 0,2  $\mu$ l *Mse*-3' adaptoru = 50 pmol, 0,2  $\mu$ l *Mse*-5' adaptoru = 50 pmol, 1,2  $\mu$ l 10mM ATP, 1  $\mu$ l (1 U) T4 Ligase, 6,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O,

(10  $\mu$ l ligačního master mixu se přidá k 50  $\mu$ l restriční směsi, promíchá se a inkubace 3 hod při 37°C).

R/L směs se po ukončení ligace naředí 10x T0.1E pufrem (540  $\mu$ l T0.1E pufu + 60  $\mu$ l R/L směsi)

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

Preselektivní amplifikace (50  $\mu$ l celkový objem): 5  $\mu$ l vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr (10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris - HCl (pH 7,4), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100), 4mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M, dNTP's, 75 ng *EcoRI*-A primeru, 75 ng *MseI*-A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy.

Na 1 vzorek: 5  $\mu$ l vzorku, 5  $\mu$ l PCR pufu, 2  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l 10 mM dNTP's, 0,15  $\mu$ l *EcoRI*-A primeru (500 ng/ $\mu$ l), 0,15  $\mu$ l *MseI*-A primeru (500 ng/ $\mu$ l), 0,2  $\mu$ l Taq (5 U/), 36,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, (45  $\mu$ l PCR se přidá k 5  $\mu$ l vzorku)

Teplotní profil PCR reakce:

počáteční denaturace	2 min	94°C,
30 cyklů:	denaturace	30 s 94°C,
	annealing	30 s 60°C,
	elongace	1 min 72°C,
konečná elongace	9 min	72°C.

Po ukončení preselektivní amplifikace se 40 µl reakční směsi 20 x naředí (860 µl TE + 40 µl templátové DNA) 10 µl nenaředeného PCR produktu se použije na elektroforézu (0,8% agarózový gel v 1x TBE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 50-500 bází.

### **Selektivní amplifikace (+3/+3) PCR - SRFA**

Selektivní amplifikace (10 µl celkový objem):

2,5 µl vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr (10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP's, 5 ng *EcoRI*-ANN-FAM primeru (fluorescenčně značen), 30 ng *MseI*-ANN primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy.

Na 1 vzorek: 2,5 µl vzorku, 1 µl PCR pufru, 0,2 µl 10 mM dNTP's, 0,087 µl *EcoRI*ANN-FAM primeru (10000 pmol), 0,095 µl *MseI*-ANN primeru (316 ng/µl), 0,1 µl Taq (5 U/µl), 6,018 µl H<sub>2</sub>O, (7,5 µl PCR produktu se přidá ke 2,5 µl vzorku).

Teplotní profil PCR reakce:

počáteční denaturace	2 min	94°C,
10 cyklů:	denaturace	30 s 94°C,
	annealing	30 s 65°C touchdown (-1°C/cyklus),
	elongace	1 min 72°C,
25 cyklů:	denaturace	30 s 94°C,
	annealing	30 s 56°C,

elongace	1 min	72°C,
konečná elongace	15 min	72°C.

Příprava vzorků pro fragmenta

ní analýzu 0,5 µl vzorku po selektivní amplifikaci, 0,25 µl standardu, 10,25 µl formamidu.

Separace fragmentů probíhala na genetickém analyzátoru ABI 3130 Applied Biosystems.

## 8. Klonování a sekvenování

Získaná cDNA byla vzata jako templát pro PCR s primery PS5 a PS15. Následovala separace na 1,5% agarosovém gelu (AG) a vizualizace pod UV světlem pomocí barviva SYBR Green. Fragmenty o velikosti cca 1300 bp byly vyříznuty z gelu, vyizolovány pomocí kitu (Gel Extraction kit, Genomed GmbH) a zaklonovány s využitím kitu TOPO TA Cloning kit (Invitrogen). Následovala izolace plazmidové DNA (JetQuick Plasmid Miniprep Spin kit (250), Genomed GmbH), restriční štěpení enzymem *EcoRI* (odebereme 5 µl plazmidové DNA, 1 µl pufru, 0,25 µl *EcoRI*, 3,75 µl H<sub>2</sub>O, inkubace při 37°C 4 hodiny) a vizualizace na AG pro ověření správnosti klonování. Následné sekvenování získaných fragmentů bylo provedeno na pracovišti firmy Invitrogen v Berlíně (ABI 3130, Applied Biosystems) a získaná data vyhodnocena.

## 9. RAPD

Izolace DNA byla provedena izolačním kitem Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Následně byla provedena PCR reakce s primery (Operon, řada B). PCR produkty byly elektroforeticky separovány na 1,5% agarosovém gelu při napětí 60 V po dobu 4 hodin a získané fragmenty DNA byly statisticky vyhodnoceny.

Primery pro RAPD PCR:

OPB12 – 5'-CCTTGACGCA-3'

OPB15 – 5'- GGAGGGTGTT-3'

Složení RAPD PCR reakce 1  $\mu$ l templátová DNA, 12,5  $\mu$ l Master Mix (PPP Master Mix, Top-Bio), 2  $\mu$ l primer B12/B15, 9,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Teplotní profil RAPD:

počáteční denaturace	5 min	94°C
44 cyklů:	denaturace	1 min 92°C
	annealing	2 min 35°C
	elongace	3min 72°C
konečná elongace	10 min	72°C

## **10. Hodnocení dat**

### **10.1. Vyhodnocení dat po PCR reakci**

Po elektroforetické separaci na AG byla spektra pruhů vyhodnocována, upravena a naskórována. Metodou digitální analýzy, která umožňuje primární zpracování elektroforeogramů a monitoruje zjištěné pozice fragmentů na AG, je možné sestavovat matice přítomnosti nebo nepřítomnosti fragmentů v blíže specifikované oblasti a vše vyhodnotit statisticky. Tím popsat i diversitu znaku, který určité spektrum může představovat.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem MVSP (Kovach Comp. Serv.), neboť umožňuje výpočty genetické vzdálenosti podle Nei-Li metriky koeficientů podobnosti. Výhodou tohoto použitého programu jsou i výpočty genetických vzdáleností a stanovování vzájemné podobnosti. K těmto účelům využívá ordinační PCO (Principal Coordinates Analysis) a clustervou analýzu UPGMA (Unweighted pair group method averages), které jsou nezbytné pro sestavování grafů.

### **10.2. Hodnocení dat sekvenačních analýz**

Data získaná na základě sekvenačních analýz byla zpracována v programech Sequence Scanner software v1.0 a Fasta PCR, a poté byly výsledky přeneseny do programů Bioedit, SplitsTree a Clustal W.



Programy Bioedit a Clustal W jsou určeny pro porovnávání získaných sekvencí, ale i pro porovnávání sekvencí s databázemi např. NCBI. V programu SplitsTree verze 4.11.3 je možné vytvářet a následně upravovat fylogenetické stromy do tvarů kladogramů a fylogramů.

## 7. Výsledky a diskuse

Kapitola výsledky a diskuse je členěna podle cílů práce a shrnuje výsledky dosažené při identifikaci S alel, hodnocení podobnosti/příbuznosti odrůd řepky českého a německého šlechtění a problematiku vývoje markeru pro hodnocení obsahu mastných kyselin.

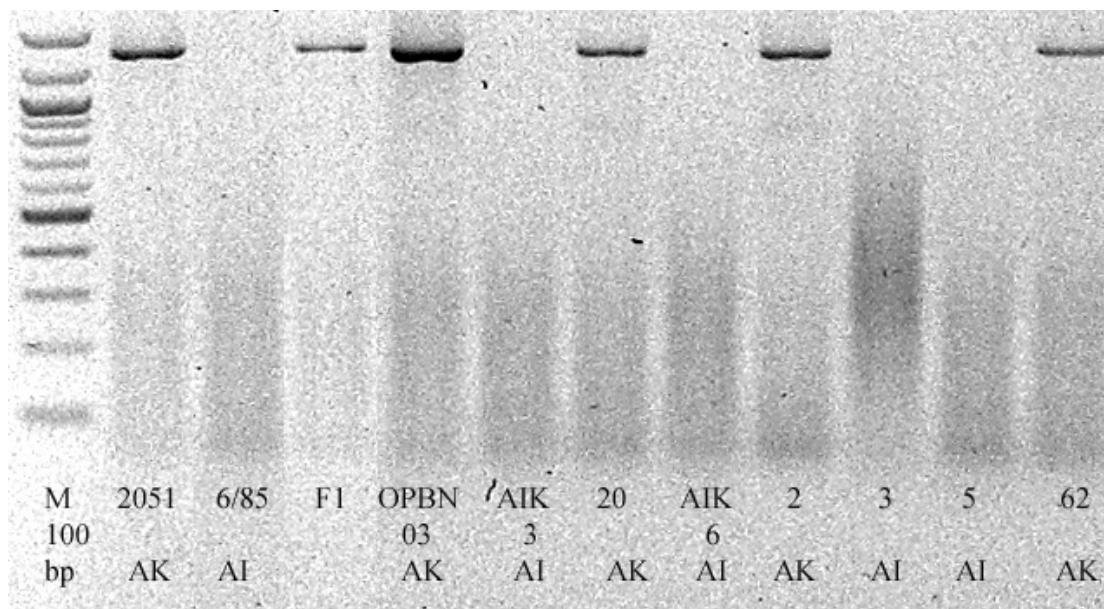
### 1. Vyhledávání AI rostlin v souboru speciálních šlechtitelských linií

Výsledky dosažené na základě PCR analýzy rostlin se specifickými primery PS5 a PS15, které amplifikují fragment genu *SLG I* o délce cca 1300 bp viz obr. č. 2 (přítomnost/nepřítomnost tohoto fragmentu a tudíž rozdělení rostlin na AK/AI), byly porovnány s daty ze semenného testu (provedeného ve VÚOL v Opavě). Touto metodou DNA markerů bylo zjištěno, že ze 122 analyzovaných rostlin je 19 autokompatibilních (AK) a 103 autoinkompatibilních (AI), semenným testem bylo dosaženo následujících výsledků: 75 rostlin bylo AI, 29 rostlin AK, ale byla zde na rozdíl od metody DNA markerů i skupina 16 rostlin přechodného typu a dvě rostliny nebyly hodnoceny vůbec, neboť se je nepovedlo dopěstovat viz tab. č. 8. Při následném porovnání výsledků markerování a semenného testu viz tab. č. 6 a 7, se ukázalo, že se v 82 případech semenný test plně shodoval s DNA markerem a v 40 případech nikoliv.

Jak je uvedeno v tab. č. 7, pět rostlin bylo DNA markery vyhodnoceno jako AK, i když byly podle semenného testu ještě hodnoceny jako autoinkompatibilní, ukázalo se, že v těchto případech byla metoda DNA markerů přísnější než semenný test. Naopak 17x byly rostliny vyhodnoceny AI podle DNA markerů a jako AK podle semenného testu. V 15-ti případech došlo k situaci, že byly rostliny podle DNA markerů AI, avšak semenným testem byly hodnoceny již jako přechodné AI/AK.

Jednou byla rostlina AK podle DNA markerů, ale semenným testem byla hodnocena jako přechodná AI/AK. Tyto přechodné varianty mohou znamenat ovlivnění výsledků z DNA markerování přítomností tzv. genů modifikátorů, již zmiňovaných v literatuře (Ekuere *et al.*, 2004), které mohou mít vliv na konečné přijetí nebo odmítnutí pylových zrn a následné opylení rostliny.

**Obr. 2:** Příklady výsledků markerování u rodičovských šlechtitelských materiálů a jejich potomstev, AI- autoinkompatibilní, AK-autokompatibilní; 6/85 AI linie odvozená z odrůdy Tandem; 2051 experimentální linie donor kvality získaná z odrůdy jarní řepky; F1 kříženec v první generaci; AIK 6 a AIK 3 dceřiné rostliny vzniklé po křížení odrůdy Tandem a linie 2051; OP BN 03 šlechtitelský materiál AK charakteru použití při dalším křížení jako zlepšovatel kvality; 2, 3, 5, 20, 62 sesterské rostliny AI a AK charakteru.



**Tab. č. 5:** Výsledky hodnocení rostlin DNA markery a semenným testem, pro snazší orientaci jsou bíle

označeny AI rostliny, modře AK rostliny a růžově rostliny přechodného typu podle semenného testu.

Legenda:

<b>AI</b>	<b>autoinkompatibilní - sem. test do 10 semen</b>
<b>AK/AI</b>	<b>nejasná reakce - sem. test 10 - 30 semen</b>
<b>AK</b>	<b>autokompatibilní - sem. test nad 30 semen</b>
<b>-</b>	<b>nebylo hodnoceno</b>

Tab. 5

původ AI	původ - křížení - DH	číslo	marker	sem. test	původ AI	původ - křížení - DH	číslo	marker	sem. test
			AI / AK	AI / AK				AI / AK	AI / AK
	AIK-6 x	1	AI	AK		AIK-6 x Rasmus	120	AK	-
	Rasmus	2	AI	AK			121	AI	AI
		3	AI	AI			122	AI	AI
		4	AI	AK/AI		AIK-6 x OP-BN-03	22	AI	AI
		5	AI	AI	T		23	AI	AK/AI
T		6	AI	AK	A		24	AI	AI
A		7	AI	AK	N		25	AI	AI
N		8	AI	AI	D		26	AI	AI
D		9	AI	AI	E		27	AI	AK/AI
E		10	AI	AK	M		28	AI	AI
M		11	AI	AK	(6/85)		29	AI	AI
(6/85)		12	AI	AK/AI	zdroj		30	AI	AI
zdroj AI		13	AI	AI	AI X		31	AI	AI
X		14	AI	AI			32	AI	AI
		15	AI	AI	2051		33	AI	AI
2051		16	AK	AI	donor		34	AI	AK
donor		17	AI	AK	kvality		35	AI	AK/AI
kvality		18	AI	AI			36	AK	AK
		19	AI	AI			37	AI	AI
		20	AK	AK			38	AI	AI
		21	AI	AI			39	AI	-
		62	AK	AK			40	AI	AI
		63	AK	AI			41	AI	AI
		64	AK	AK			42	AI	AI
		65	AK	AK			43	AI	AI
		66	AK	AK			44	AI	AI
		67	AK	AK			45	AI	AI
		68	AI	AK			46	AI	AI
		69	AK	AK/AI			47	AI	AI
		70	AK	AK			48	AI	AI
		71	AK	AK			49	AI	AI

		72	AK	AK				50	AI	AI
		73	AI	AK				51	AI	AI
		74	AI	AK				52	AI	AK/AI
		75	AI	AK/AI				53	AK	AK
		76	AI	AK				54	AI	AI
		77	AI	AK				55	AI	AI
		78	AI	AI				56	AI	AI
		79	AI	AI				57	AI	AI
		80	AI	AK/AI				58	AI	AI
		81	AI	AI				59	AI	AI
		111	AI	AK				60	AI	AI
		112	AI	AK/AI				61	AK	AI
		113	AI	AI				82	AI	AK/AI
		114	AI	AK				83	AI	AI
		115	AK	AI				107	AI	AI
		116	AK	AI				108	AI	AI
		117	AI	AI				109	AI	AI
		118	AI	AI				110	AK	AK
		119	AI	AI						

Tab. 5

			marker	sem. test						
původ AI	původ - křížení - DH	číslo	AI / AK	AI / AK						
	AIK-3 x OP-571/00	84	AI	AI						
		85	AI	AK/AI						
		86	AI	AK/AI						
		87	AI	AI						
<b>T</b>		88	AI	AK						
<b>A</b>		89	AI	AK/AI						
<b>N</b>		90	AI	AI						
<b>D</b>		91	AI	AI						
<b>E</b>		92	AI	AI						
<b>M</b>		93	AI	AI						
<b>(6/85)</b>		94	AI	AI						
<b>zdroj AI</b>		95	AI	AI						
<b>X</b>		96	AI	AI						
		97	AI	AI						
<b>2051</b>		98	AI	AK/AI						
<b>donor</b>		99	AI	AI						
<b>kvality</b>		100	AI	AK/AI						
		101	AI	AI						
		102	AI	AI						
		103	AI	AI						
		104	AI	AK						
		105	AI	AI						
		106	AI	AI						

Tab. č. 6: Souhrné zhodnocení výsledků DNA markerování a semenného testu

	AI	AK	AI/AK	nehodnoceno
<b>Marker</b>	103	19	0	0
<b>Sem. test</b>	75	29	16	2

Tab. č. 7: Vzájemné porovnání výsledků molekulárního markerování a semenného testu.

M/ST	počet případů
AI-AI	70
AI-AK	17
AI-AI/AK	15
AK-AK	12
AK-AI	5
AK-AI/AK	1
AI-0	1
AK-0	1

V 80,33% případů se výsledky molekulárního markerování a semeného testu shodují a v 19,67% nikoliv.

V literatuře je S lokus popsán u celé řady rostlin jako multi alelický, např. 22 alel se nachází u rodu *Iberis* (Bateman, 1955), 34 u rodu *Raphanus* (Sampson, 1957), 50 u druhu *Brassica oleracea* (Brace *et al.*, 1994), 30 u druhu *Brassica campestris* (Nou *et al.*, 1993), u druhu *Brassica napus* je detekováno 50 alel.

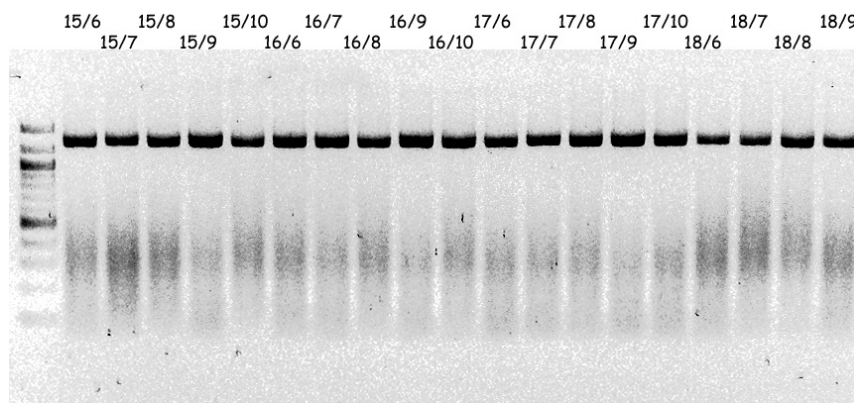
Při studiu druhu *Brassica campestris* Nishio *et al.* (1996) našli a publikovali primery PS5, PS15 a PS 18, které amplifikují fragment genu *SLG I*.

Gen *SLG* se podílí na AI reakci, ale jeho přesná úloha při procesu rozpoznávání S haplotypu pylového zrna není zatím objasněna, stal se však jedním z markerů AI/AK rostlin. Kromě něho se jako marker uplatnil i gen *SCR* (Žaludová, 2007), i když tento se stal specifickým markerem zatím pouze AI linií odvozených z linie odrůdy Tandem. V prvních několika generacích po křížení dalších šlechtitelských materiálů s linií Tandem byl tento marker spolehlivý a odlišil AI a AK jedince, s narůstajícím počtem generací však jeho rozlišovací schopnost slábla.

## 2. Vyhledávání nových zdrojů autoinkompatibility a dalších alel genu *SLG I*

Analyzováno bylo 320 rostlin pocházejících z 32 odrůd českého a německého šlechtění. Pomocí metody PCR se specifickými primery PS5 a PS15 bylo v prvním kroku zjišťováno, zda-li nasedají na DNA a dochází k amplifikaci fragmentu. Bylo zjištěno, že cca 1300 bp dlouhé fragmenty charakteristické pro *SLG I* gen, které jsou pomocí těchto primerů získávány, jsou přítomny u všech testovaných rostlin. Jako příklad jsou uvedeny odrůdy Oponent (15), Opus (16), Rechbergers winterraps (17), Olquel (18) na obr. č. 3.

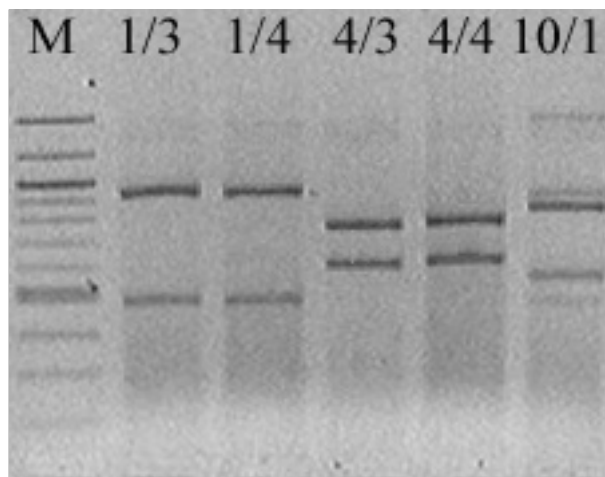
**Obr. č. 3** Pomocí PCR pro gen *SLG I* s primery PS5 a PS15 se amplifikuje fragment 1300 bp u odrůd č. 15/6 - 10 Oponent, č. 16 / 6 – 10 Opus, č. 17/6 - 10 Rechbergers winterraps, č. 18/6 - 9 Olquel. Nachází se ve všech sledovaných rostlinách.



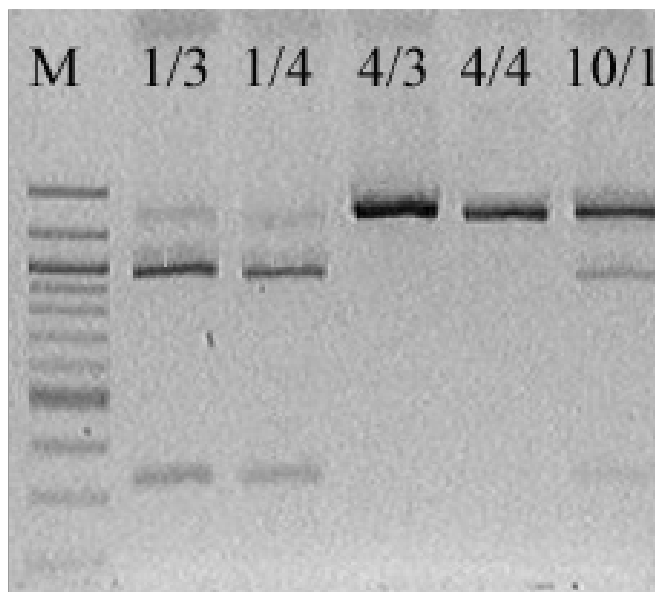
Při prvním screeningu se ukázalo pouze, že ve všech sledovaných rostlinách je přítomná alela genu *SLG I*, na niž nasedají primery PS5 a PS15. Následovalo restriční štěpení enzymy *EcoRI*, *MseI*, *AfaI*, *MboI* a *HindIII*. Výsledky restričního štěpení jsou znázorněny na obrázcích č. 4a - 6. Enzym *EcoRI* poskytl štěpením DNA tři různá spektra fragmentů viz. obr. č. 4a a je pravděpodobné, že představují tři různé alely genu *SLG I*. Enzym *MseI* štěpil fragmenty stejných odrůd jako předchozí enzym, ale spektrum vzniklých fragmentů je jiné viz. obr. č. 4b a mohli bychom se domnívat, že potvrzuje výsledek získaný při prvním restričním štěpení enzymem *EcoRI*, ale při štěpení dalších vzorků už se jejich

cesty rozchází a štěpily různé vzorky. Další restrikční enzymy se ukázaly být nevhodné, enzym *HindIII* neštěpil fragment DNA vůbec viz. obr. č. 5, proto nebyl dále používán. Enzym *AfaI* sice štěpil DNA na použitelné spektrum fragmentů, bohužel však u všech sledovaných jedinců stejné viz obr. č. 6. Enzym *MboI* viz obr. č. 5 také štěpil a poskytoval využitelné spektrum fragmentů pro hodnocení, ale odlišil pouze tytéž jedince jako *EcoRI* a *MseI*, tudíž se jeho další použití jevilo jako zbytečné.

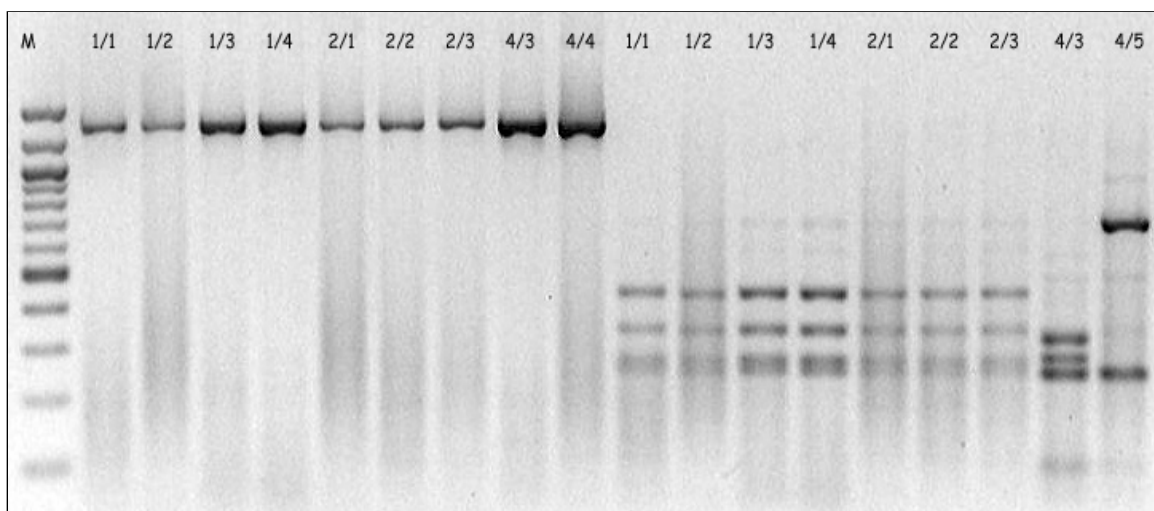
Obr. č. 4a: Příklad PCR-RFLP s enzymem *EcoRI* u odrůd Třebíčská (1/3, 1/4), Česká krajová (4/3, 4/4), Sonáta (10/1). Jsou zde patrná tři různá spektra fragmentů označená šipkami, což představuje tři různé fenotypy genu *SLG I*.



Obr. č. 4b: Příklad PCR-RFLP s enzymem *Mse I* u odrůd Třebíčská, (1/3, 1/4), Česká krajová /4/3, 4/4), Sonáta (10/,1). Jsou zde patrná rovněž tři různá spektra fragmentů, což představuje tři různé fenotypy genu *SLG I*.

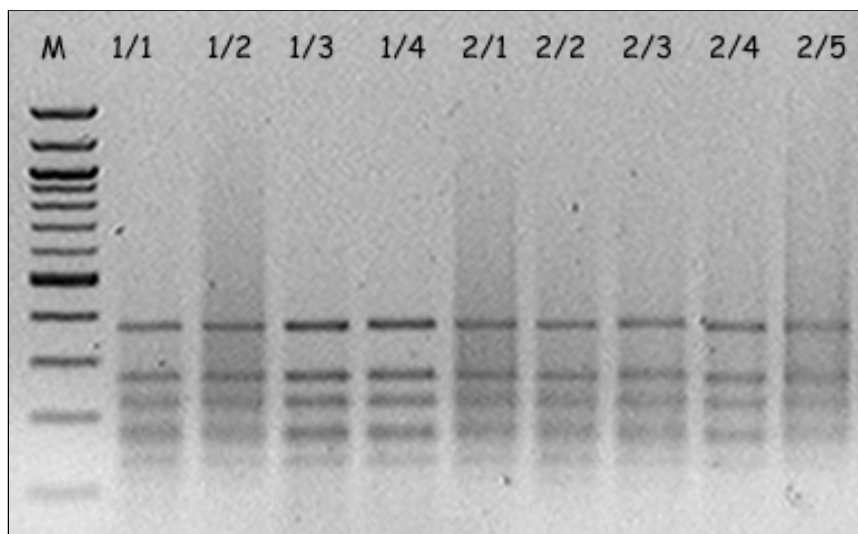


Obr. č. 5: Příklad PCR-RFLP s enzymy *HindIII* a *MboI* u odrůd Třebíčská (1/1, 1/2, 1/3, 1/4), Přerovská (2/1, 2/2, 2/3), Česká krajová (4/3, 4/5). Enzym *Hind III* fragment genu *SLG I* u žádné z odrůd neštěpil. Enzym *Mbo I* měl nízkou frekvenci štěpení, která poukazovala na rozdíly pouze v rámci jediné odrůdy Česká krajová (4/3, 4/5), ale u dalších odrůd odhalila pouze jeden fenotyp.

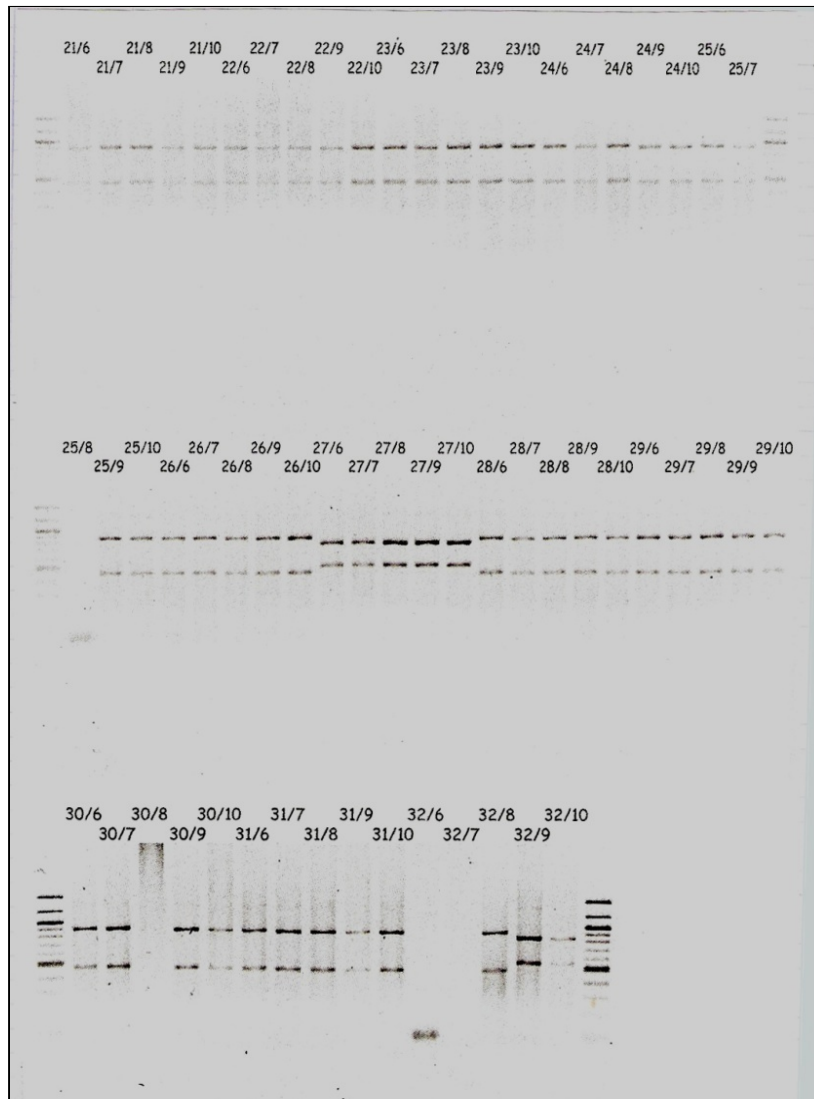


Obr. č. 6: Příklad PCR-RFLP s enzymem *AfaI* u odrůd Třebíčská (1/1, 1/2, 1/3, 1/4), Přerovská (2/1, 2/2, 2/3, 2/4, 2/5), tento enzym rozštěpil DNA, ale nezaznamenali jsme žádnou variabilitu v souboru odrůd.





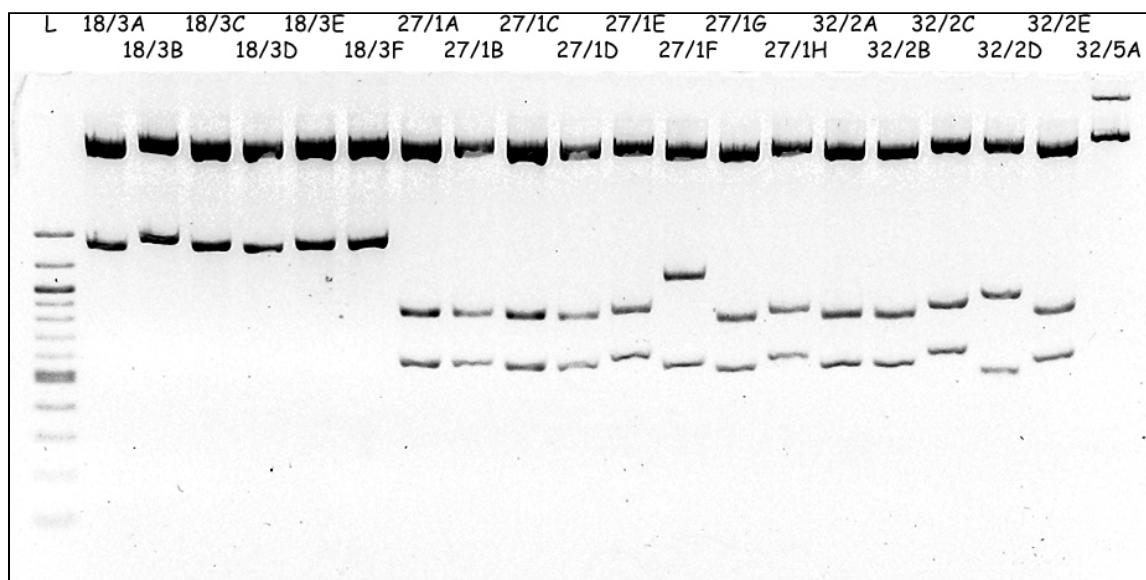
Obr. č. 7: Ukázka štěpení PCR – RFLP s enzymem *EcoRI* u odrůd: Zorro (21) fragmenty o velikosti 900 – 400 bp; Rasmus (22), 900 – 400 bp; Orkan (23), 900 – 400 bp; Pilot (24), 900 – 400 bp; Ramiro (25), 900 – 400bp; Smart (26), 900 – 400 bp; Trend (27), 800 – 500bp; Digger (28), 900 – 400 bp; Siska (29), 900 – 400bp; Winner (30), 900 – 400 bp; Petra (31), 900 – 400bp; Senator (32), 200bp, 900 – 400bp, 800 – 500bp, 900 – 400 bp.



PCR – RFLP analýzou se povedlo odlišit 32 rostlin s různými spektry štěpených fragmentů př. obr. č. 7, (ukázka štěpení enzymem *EcoRI*). U těchto vzorků byla opět provedena PCR analýza s primery PS5 a PS15 a elektroforetická separace na agarosovém gelu, následovala izolace vyříznutých fragmentů z agarosového gelu. Získaná DNA z fragmentů po PCR byla zaklonována do vektoru pomocí kitu TOPO A Cloning kit a následně štěpena viz. obr. č. 8.

**Obr. č. 8** Zaklonované fragmenty genu *SLG I*, vyštěpené z plazmidu enzymem *EcoRI*, u odrůd Olquel (18/3 A – F) neštěpený fragment 1300bp; Trend (27/1 A - G) spektrum fragmentů 800 – 500bp, 900 – 600bp, 1000 – 500bp; Senator (32/2 A - E) 800 – 500bp, 900 – 600bp, 1000 – 500bp; 32/5A chybí fragment. Opět je patrné,

že získané sekvence jsou odlišné a poskytují různá spektra naštěpených fragmentů. Jednotlivé klony fragmentů genu *SLG I* u rostlin jsou označovány písmenem.



Opět se potvrdila skutečnost, že ve vzorcích se nachází více fenotypů genu *SLG I*, proto byly vzorky různých fenotypů vybrány a osekvenovány. U vzorků Senátor, Trend, Slovenská krajová, Sonáta, Olquel a WRG 19 byla rovněž vyizolována připravena cDNA a sekvenována.

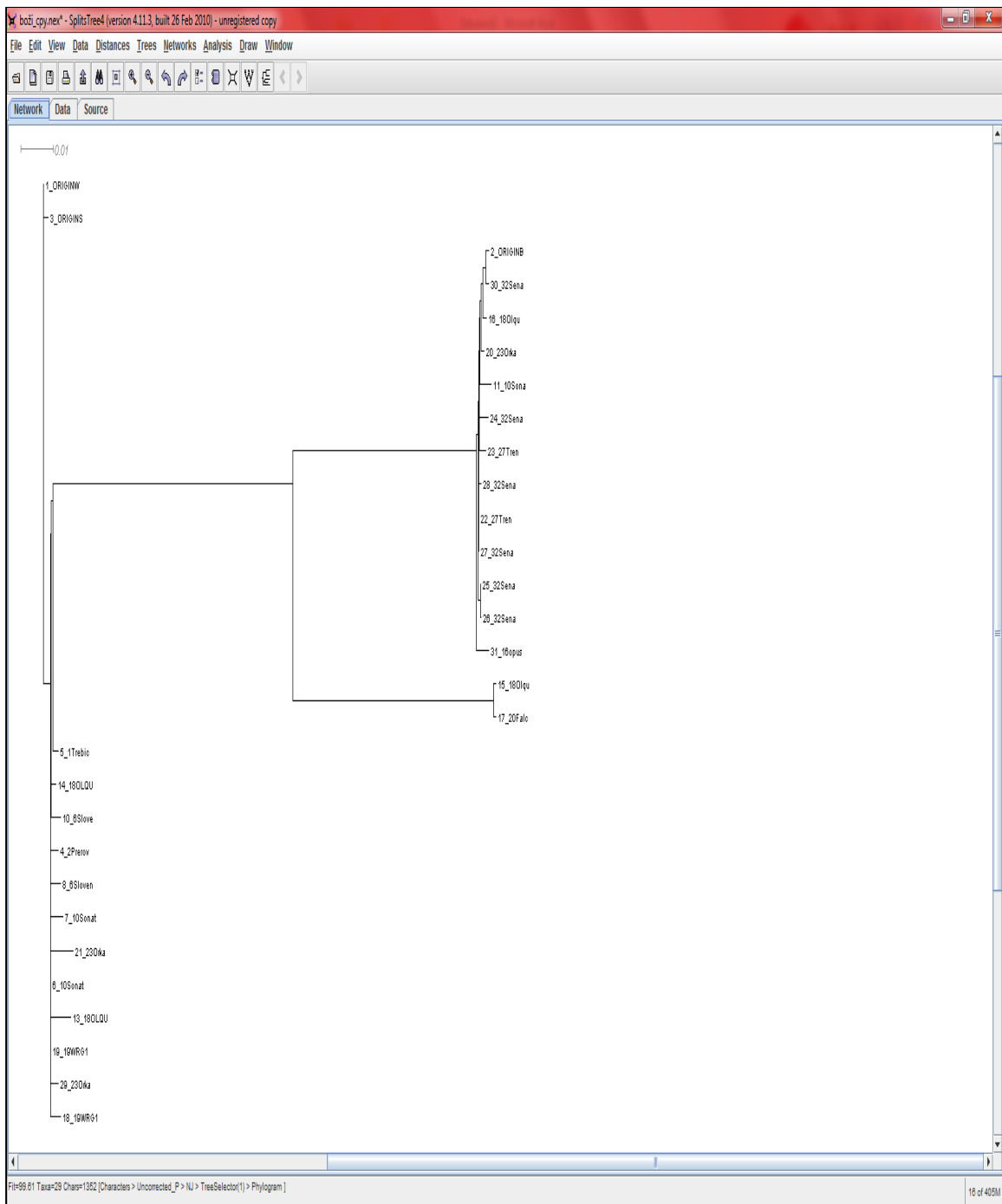
Tab. č. 8. Tabulka odrůd představující diverzitu *SLG I* genu v souboru sledovaných odrůd, alela W – alela nalezená v odrůdě Westar, alela B – alela nalezená v odrůdě Brownowski.

Odrůda	Alela W	Alela B	jiná
<b>Třebíčská</b>	1	0	0
<b>Přerovská</b>	1	0	0
<b>Slovenská kr.</b>	2	0	0
<b>Sonáta</b>	2	1	0
<b>Opus</b>	0	1	0
<b>Olquel</b>	2	1	1
<b>WRG 19</b>	2	0	0
<b>Falcon</b>	0	0	1
<b>Orkan</b>	1	1	0
<b>Trend</b>	0	2	0
<b>Senator</b>	0	6	0

Sekvence všech fragmentů byly hodnoceny programy Bioedit, Fasta PCR, Splits tree a následovně porovnávány s fragmenty přítomnými v databázi NCBI pomocí programu ClustalW.

**Obr. č. 9 Rozdělení odrůd podle získaných sekvencí genu *SLG* / pomocí programu Splits Tree.**

**(1 OriginW – Westar, 2 OriginB – Bronowski, 3 Origins – A10, 4 2Prerov - Přerovská 5 1Trebic – Třebíčská, 6 10Sonat - Sonáta, 7 10Sonat – Sonáta, 8 6Slove - Slovenská krajová, 9 chybí, 10 6Slove- Slovenská krajová, 11 10Sona – Sonáta, 12 chybí, 13 18Olqu – Olquel, 14 18Olqu – Olquel, 15 18Oqu – Olquel, 16 18 Olqu – Olquel, 17 20Falc – Falcon, 18 19WRG19, 19 19WRG19, 20 23Orka – Orkan, 21 23Orka - Orkan, 22 27Tren – Trend, 23 27Tren – Trend, 24 27Tren – Trend, 25 32 Sena – Senator, 26 32Sena – Senator, 27 32Sena – Senator, 28 32Sena – Senator, 29 23Orka – Orkan, 31 16Opus – Opus, 32 chybí.)**



Bylo hodnoceno 29 taxonů, což odpovídá 29 testovaným rostlinám. Bylo sledováno 1352 znaků u každé sekvence a bylo zjištěno, že 900 znaků je konstantních pro všechny sledované vzorky a v ostatních se liší. Vzorky č. 9, 12, 32 v obrázku chybí, neboť získané sekvence byly nehodnotitelné.

Pomocí programu SplitsTree se nám podařilo rozdělit jednotlivé sekvence odrůd do čtyř hlavních skupin. První skupina označená červenou šipkou zahrnuje dvě sekvence (origin Westar, origin A 10). Origin Westar (sekvence pocházející z odrůdy Westar) je získána z databáze NCBI a origin sequence A10 je sekvence nefunkční alely A10 pulikovaná v literatuře (Göring *et al.*, 1992), pocházející rovněž z odrůdy Westar (respektive Tower, která představuje kratší variantu sekvence nalezené rovněž v NCBI).

Druhá skupina označená modrou šipkou obsahuje skupinu odrůd, které nesou sekvence alel genu *SLG I* podobné sekvenci alely odrůdy Westar uložené v NCBI. Do skupiny sekvencí alel podobných alele A10 a origin Westar jsou zařazeny alely pocházející z odrůd WRG19, Přerovská, Sonáta, Olquel, Orkan, Třebíčská, Slovenská krajová. To jsou převážně odrůdy staré, výjimkou je odrůda Orkan, která byla registrovaná v roce 1998.

Odrůdy, nesoucí alelu se stejnou sekvencí jaká byla poprvé publikována u odrůdy Bronowski jsou označené zelenou šipkou, jedná se o odrůdy Trend, Senátor, Orkan, Olquel, Sonáta, Opus, což jsou odrůdy moderní. Výjimky tvoří odrůdy Olquel a Sonáta. Fakt, že bylo u odrůdy Senátor nalezeno 6 různých fenotypů, je velmi překvapivé zjištění, neboť takto vysokou diverzitu u postmoderní liniové odrůdy jsme nepředpokládali.

Poslední malá skupina označená červenou šipkou zahrnuje sekvence odrůd Falcon a Olquel. Tato stará německá odrůda se nacházela ve všech třech skupinách a splňuje předpoklad o vyšší diverzitě starých odrůd.

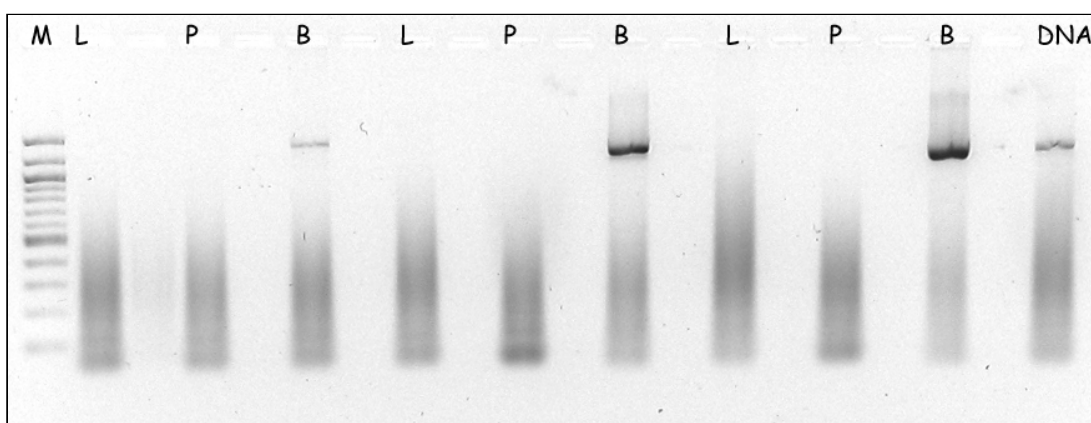
Pro detekci S alel se s úspěchem používá metoda PCR-RFLP (CAPS). Nishio *et al.* (1996) publikovali primery PS5, PS15 a PS 18, které našli při studiu druhu *Brassica campestris*. Využili metodu PCR – RFLP při studiu genotypu S15, kdy pomocí primerů PS5 a PS15 amplifikovali fragment 1300bp, který následně štěpili enzymy *MboI* a *MspI*, použili i další specifický primer PS18, který spolu s primerem PS5 také amplifikoval fragment 1300bp. Po štěpení endonuklázami dával také různá spektra fragmentů. Podrobnější nukleotidovou analýzou a Southern hybridizací bylo dokázáno, že patří do třídy I.

Při analýze byl zkoumán i původní předpoklad vycházející ze studií Stein *et al.* (1991) a Sato *et al.* (1991), že se gen *SLG I* aktivuje pouze v určité etapě ontogeneze a pouze ve zcela

specifickém pletivu. Pro analýzu byla použita cDNA získaná z mRNA zkoumaného pletiva, kterým byl list, nezralé prašníky a nezralé i zralé blizny (zralé blizny byly později ze zkoumání vyloučeny, neboť u otevřeného květu nemáme jistotu sterilního odběru materiálu, kterou tato analýza bezpodmínečně potřebuje).

Pro některé vytipované vzorky byla použita pro klonování a sekvenování jako zdrojová DNA i syntetizovaná cDNA, která by měla mapovat aktuální stav exprimovaných alel u dané rostliny, avšak výsledky pouze potvrdily již popsané skutečnosti.

**Obr. č. 10** Analýza různých pletiv (L- list, P – prašník, B- blizna) na přítomnost exprimovaného genu *SLG I* u odrůd Zorro (21), Falcon (20) a Oponent (15) a jejich porovnání s kontrolním vzorkem DNA.



Jak je patrné na obr. č.10, bylo potvrzeno, že se gen *SLG I* projevuje pouze v bliznách, totéž popisují ve svých pracích i Nasrallah *et al.* (1985) a Göring *et al.* (1992), že se skutečně jedná o gen *SLG I*, je potvrzeno porovnáním s kontrolním vzorkem DNA. Podle Sato *et al.* (1991) a Stein *et al.* (1991) je nízká úroveň mRNA genů *SLG* a *SRK* přítomna i v prašnicích, ale proteiny těchto genů nebyly v tkáních prašníků dosud detekovány (Delourme *et al.*, 1995). Nám se rovněž nepodařilo prokázat přítomnost RNA alely genu *SLG I* v prašnicích.



Dolanská a Čurn (2004) použili metodu PCR – RFLP při studiu recesivního genu *SLG* třídy II. Zjistili, že DNA fragment recesivního genu souhlasil s *SLG* genem, který byl objeven u odrůdy Westar. Další zkoumané odrůdy měly shodná elektroforetická spektra, která odpovídala nefunkční alele A10 nalezené u druhu *Brassica campestris*, u řepky (*Brassica napus* L.) se nachází v genomu A pocházejícím právě z *B. rapa* (syn. *campestris*).

Park *et al.* (2001) prováděli svá testování na odrůdách zelí (*Brassica oleracea* L.) a brokolice (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*). Pomocí techniky PCR - RFLP se jim podařilo odhalit 20 různých haplotypů. Použili tuto metodu s různými primery vztahujícími se k *SLG* genu a výsledky korespondovali s provedeným opylovacím testem. Selektivní primery amplifikovali fragment 1150bp ve všech sledovaných 40 liniích. U tří z 20 linií byly pro amplifikaci použity primery amplifikující fragment charakteristický pro třídu I genu *SLG* a u ostatních byly použity primery pro třídu II, ale nepodařilo se obě třídy o sebe odlišit. Poté tento test prováděli i u linií brokolice, u 15 z 20 vzorků použili primerový pár pro třídu I genu *SLG* I a u 5 pro třídu II. Následně štěpili amplifikované fragmenty pomocí restričních endonukleáz a vybírali tu, která bude nejlépe korespondovat s výsledky dialelního křížení a jako nejlepší se jim jevila *Hinfl*. Výsledky štěpení, které poskytovala, se plně shodovali se sekvenční nukleotidovou analýzou. PCR – RFLP byla rychlejší a pečlivější v identifikaci S haplotypů a její nespornou výhodou při jejich odhalování je nezávislost testu na době kvetení, na kterém je závislý test opylování.

Möhring *et al.* (2005) testovali rodičovské linie (AI - 3875/3/3; AK - Lirajet) a jejich F2 potomstvo, skládající se z 91 rostlin. Výsledky, kterých dosáhli pomocí selektivních primerů, korespondovaly s opylovacím testem, kdy testovali jednotlivé rostliny po samosprášení. Pro detekci polymorfismu mezi segregující populací použili s úspěchem enzym *Mbo* I, který jsme testovali i my, ale nakonec jsme se přiklonili k použití enzymů *Mse*I a *Eco*RI.

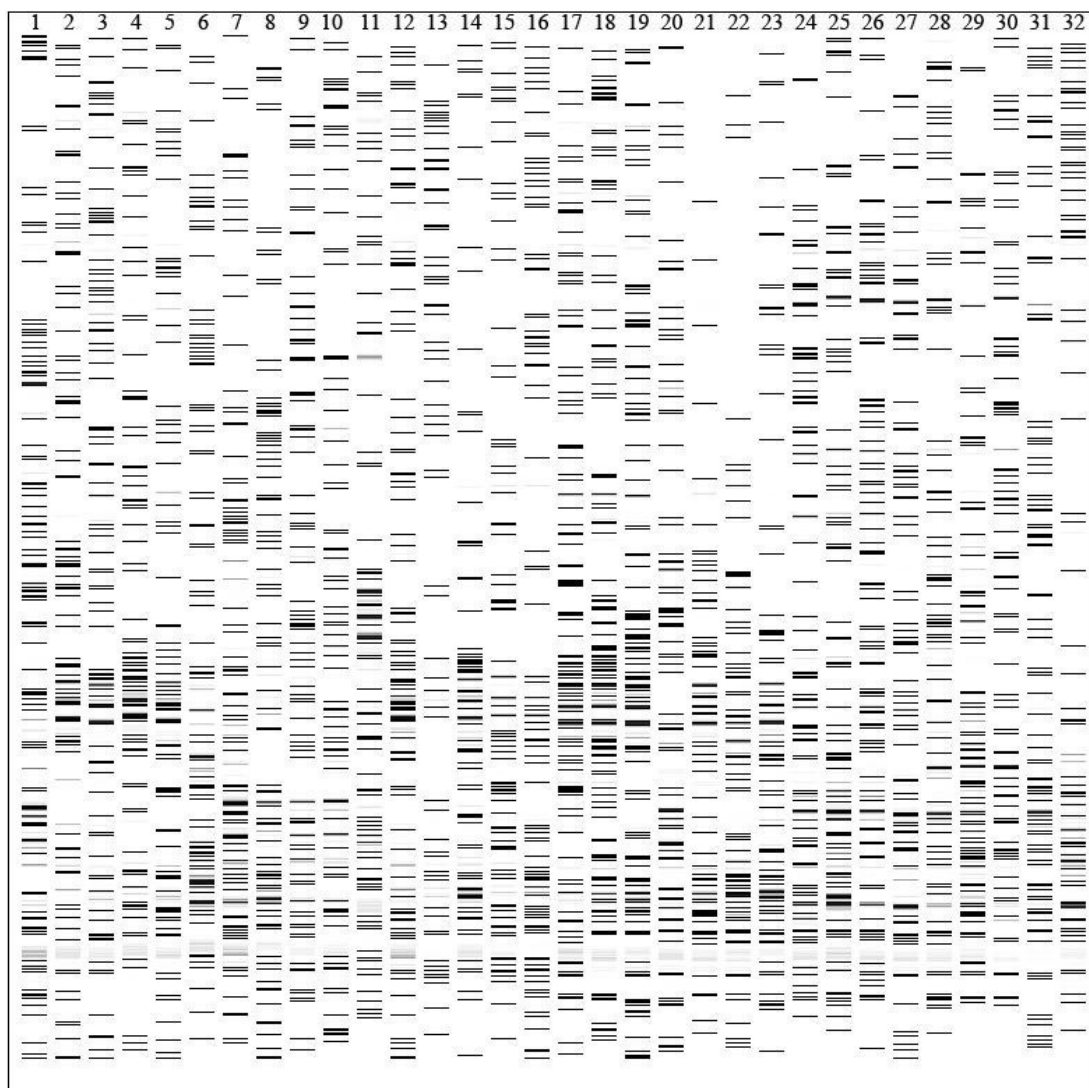
Metoda PCR – RFLP byla úspěšně použita i u dalšího brukvovitého zástupce *Raphanus sativus*, Niikura a Matura (1998) testovali 16 linií pěstovaných ředkví. Byly

použity primery s vysoce konzervativními sekvencemi genu *SLG I* z druhu *Brassica oleracea*, pomocí nich se linie daly spolehlivě rozdělit na dvě skupiny.

### **3. Stanovení míry podobnosti československých, českých a německých odrůd.**

Na stejném souboru vzorků (české, československé a německé odrůdy), který byl použit u předchozí analýzy, byla provedena AFLP analýza. A to hlavně z důvodu vyřešení otázky podobnosti a odlišnosti jednotlivých odrůd. Tato analýza na rozdíl od analýzy specifických genů postihuje komplexně celý zkoumaný genom a fingerprinty získané po této analýze mohou zahrnovat jak kódující tak nekódující oblasti.

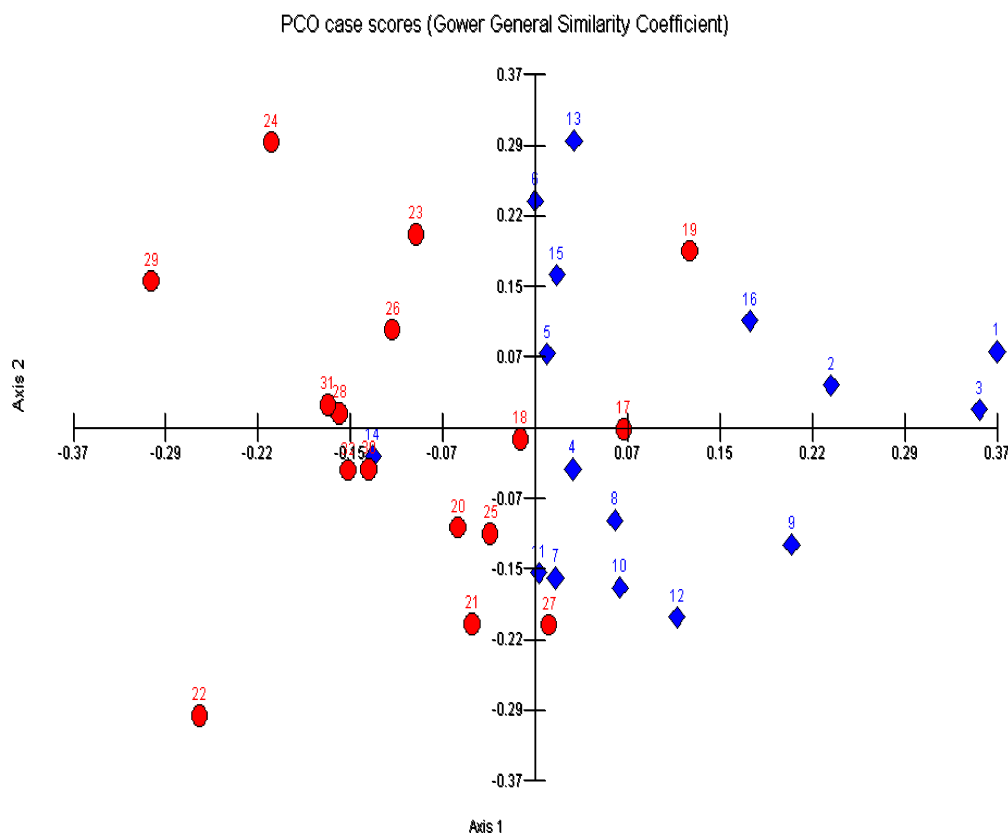
**Obr. č. 11 Zdrojový obrázek fragmentační analýzy po úpravě programem Genographer, který byl použit jako data pro skórování v programu UltraQuant 6.0.**



Z tohoto zdrojového obr. č. 11 byla molekulární data naskórována pomocí programu UltraQuant 6.0. Naskórována byla pouze data se silným signálem (markerem). Pruhy o slabé intenzitě byly z datové matice odstraněny. Následně byla sestavena binární matice přítomnosti/nepřítomnosti „pruhů“ v dané zóně a provedeno statistické hodnocení a analýza těchto dat specializovaným softwarem MVSP (MultiVariate Statistical Package, sloužící pro výpočet koeficientů genetické podobnosti, koeficientů genetické identity, výpočet genetické vzdálenosti) a následovala koordinační a shluková analýza.

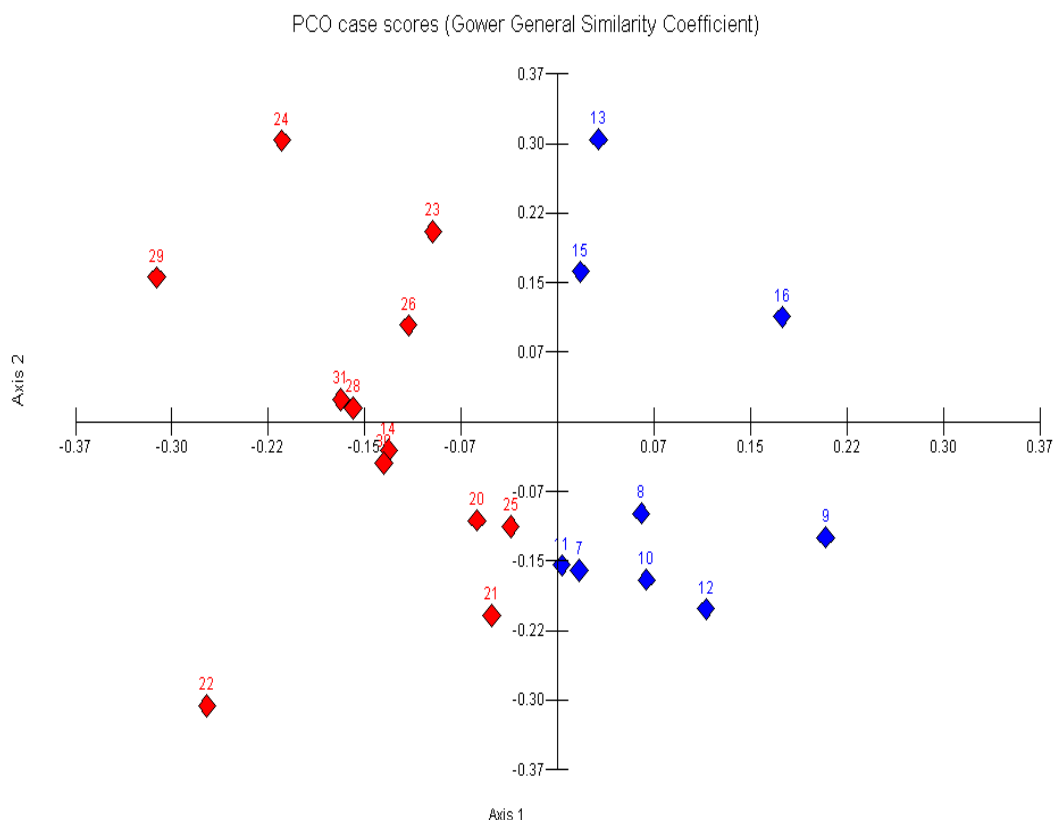
**Obr. č. 12 Výsledek PCO analýzy AFLP dat. Modře jsou znázorněny české i československé odrůdy (1-16) a**

červeně odrůdy německé (17-32). Zobrazeny jsou všechny odrůdy bez korekcí, ale i tak je zde možno zaznamenat, rozdělení odrůd podle jejich geografického původu.



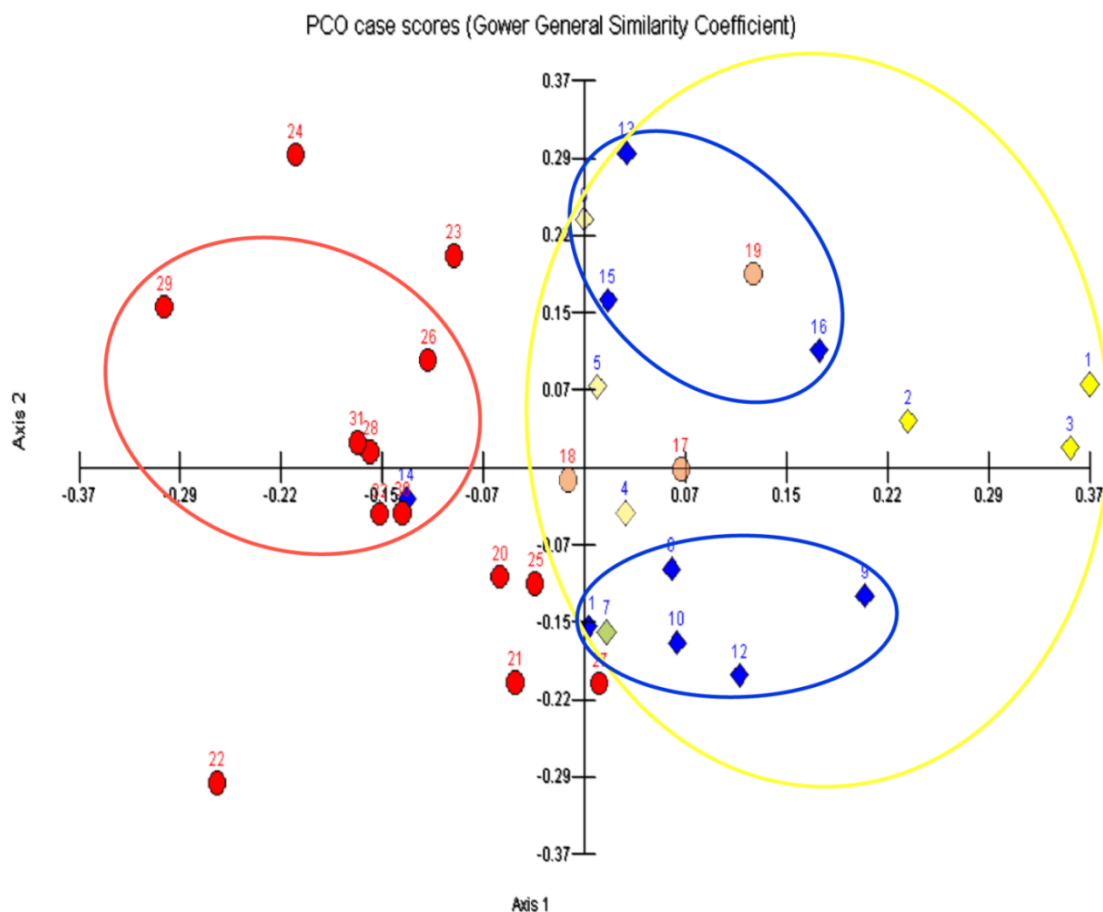
Obr. č. 12 ukazuje výsledky PCO analýzy AFLP dat. Hlavní rozčlenění na české a československé (modře) a německé (červeně) odrůdy je zde narušeno prolínáním některých odrůd. Jedná se o staré německé odrůdy, které jsou vnořeny do spektra odrůd českých. Tato situace ale nemusí být nelogická, je pravděpodobné, že staré německé odrůdy typu populace (17, 19) a staré české krajové odrůdy (1, 2, 3, 4) mohou mít společné některé předky. Dalším „přeběhlíkem“ je jarní odrůda Trend (27) uznaná v roce 2005, která se zařadila mezi odrůdy české a tvoří skupinu s odrůdami osmdesátých a z počátku devadesátých let, toto přiřazení může být celkem náhodné, neboť odrůda 27 je jarního charakteru a toto zařazení spíše vyjadřuje jeho výraznou odlišnost od ozimých odrůd německých. České odrůdy mají mezi německými také svého zástupce a tím je Odila (14), která se nachází mezi postmoderními německými odrůdami, ale i zde je tato skutečnost snadno vysvětlitelná, neboť odrůda vznikla na základě bližší spolupráce mezi českými a německými šlechtiteli.

**Obr. č. 13** Výsledek PCO analýzy po korekci AFLP dat programem MVSP, při korekci byly z grafu odstraněny některé odrůdy (staré české 1,2,3,4 a staré německé 17,18,19 a německé odrůdy 27, 32 pro svůj odlišný jarní charakter) a česká odrůda 14 německého původu byla přiřazena mezi německé. Na grafu je patrné jasné rozdělení odrůd na české a německé.



Podle obr. č. 13 je zřejmé, že po analýze dat z korigované matice programem MVSP jsou na grafu dobře viditelné 2 klastry, které názorně rozdělují skupinu odrůd podle geografické příslušnosti, na odrůdy mající původ v českých resp. německých genových zdrojích. Rozdíl v podobnosti mezi českými a německými odrůdami není tak velký, protože se jedná o velmi blízkou oblast pěstování a šlechtění. Mnohem výraznějších rozdílů by bylo dosaženo při analýzách odrůd pocházejících ze vzdálených oblastí jako by bylo například porovnání odrůd z Japonska či Austrálie nebo z Číny s českými odrůdami, neboť při jejich vytváření byly použity velmi odlišné genotypy.

Obr. č. 14 Výsledky PCO analýzy AFLP dat zkoumané z pohledu šlechtitelských cílů, popisují mimo jiné i stav českého a německého šlechtění. V současnosti u německého je zaznamenán trend posunování vývoje od odrůd starých k těm nejnovějším postmoderním, což je nejpravděpodobněji způsobeno vnesením nových genových zdrojů do stávajícího genotypu.



Při podrobnějším zkoumání můžeme vypočítat další informace, které nám obr. č. 14 nabízí. Červená skupina zahrnuje postmoderní německé odrůdy 26, 28, 29, 30, 31, všechny jsou registrovány v období 2005-2007, je k nim přiřazena též česká Odila (14) 1997, která se svým původem hlásí k společným německým předkům.

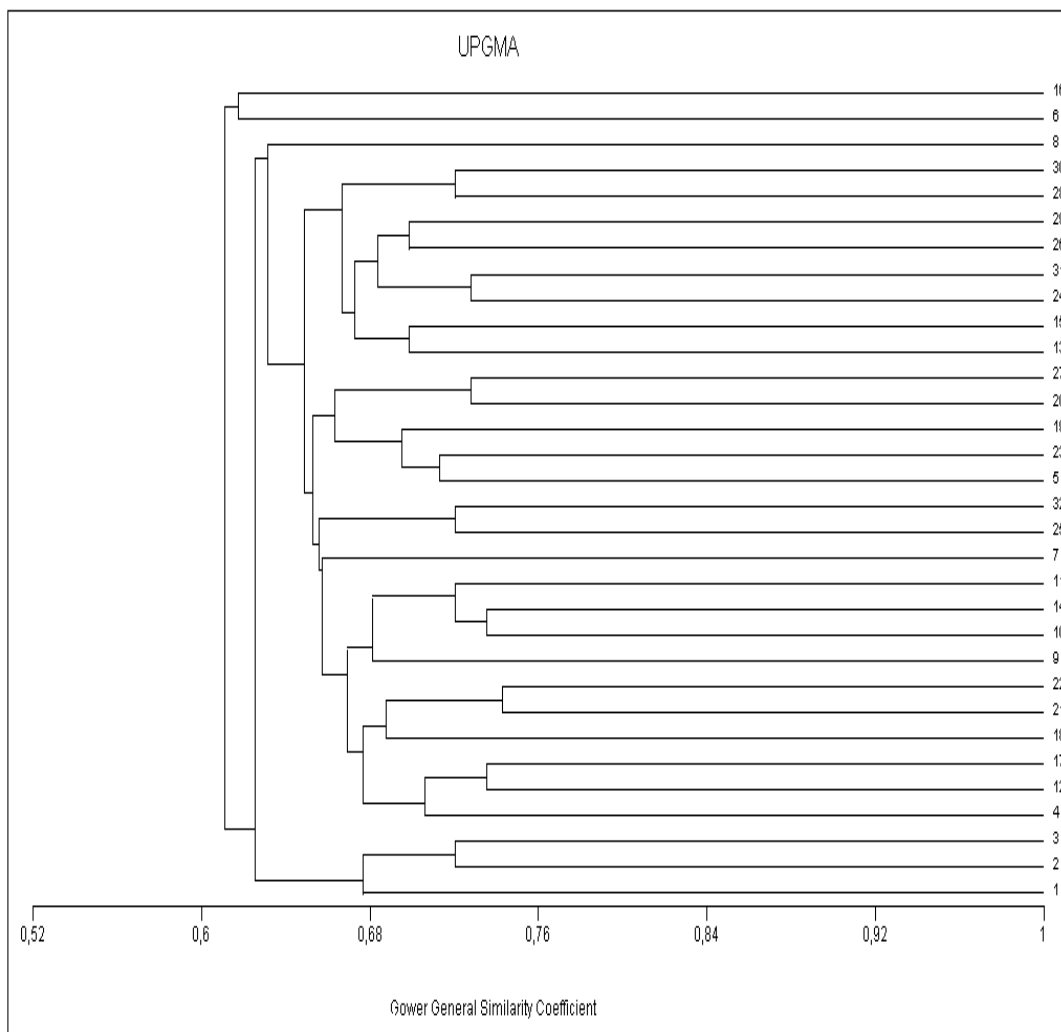
V modře označené skupině jsou soustředěny české odrůdy 7,8,9,10,11,12 pocházející z období let 1978-1993, jsou charakteristické postupným snižováním kyseliny erukové až na

minimální množství. A české moderní liniové odrůdy 13, 15, 16 bez kyseliny erukové a s minimem glukosinolátů jsou zařazeny v druhé modré skupině.

Obrázek č. 14 nám ale také poskytuje informace o stavu německého a českého šlechtění. Zatímco u německého můžeme zaznamenat výrazný posun vývoje odrůd od starých k postmoderním, s vysokou pravděpodobností používání nových zdrojů s dalšími zušlechťujícími vlastnostmi, což je v obrázku naznačeno šipkou vedoucí zprava doleva, české šlechtění jakoby nestále přešlapovalo na jednom místě, což je v obr. č. 14 znázorněno žlutou skupinou, odrůdy jako by byly stále tytéž, využívající stále stejné genové zdroje, není zde zaznamenán žádný posun. Je docela pravděpodobné, že takovýto přístup ke šlechtění nemusí vést k nějaké katastrofě, ale může mít za následek sjednocení odrůd podobného genotypu, což při současném trendu hybridního šlechtění může nastat situace, že po křížení odrůd velmi podobného charakteru nenastane kýžený heterózní efekt nebo alespoň nebude tak výrazný, jak by mohl být.

Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k podrobnějšímu zkoumání původů odrůd z dostupných informací v databázi EVIGEZU, popřípadě získaných od pana Ing. Zehnálka. Bylo zjišťováno, zdali se nachází v rodokmenech společní předkové u jednotlivých odrůd, ale nebyla zaznamenána žádná bližší spojitost. Důvodem mohou být jednak neúplné informace o rodokmenu, kde jsme podle různých označení šlechtitelských materiálů nevystopovali společné předky, ale i krátká rodokmenová řada, která je zde uvedena. Dalším z důvodů by mohl být i subjektivní vliv samotného šlechtitele vybírajícího vhodné materiály postupující ve šlechtitelském procesu dále. Je sice mnoho laboratorních testů, které vyhodnocují různé parametry u jednotlivých zkoušených materiálů, ale nakonec je to vždy šlechtitel, který na základě zjištěných parametrů rozhodne.

**Obr. č. 15 Výsledky shlukové analýzy UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) všech analyzovaných odrůd, které vyjadřují míru podobnosti jednotlivých odrůd.**



Čísla 1-32 znázorňují odrůdy, čísla na spodní ose vyjadřují koeficient podobnosti

Pomocí shlukové analýzy byl vytvořen kladogram, viz obr. č. 15 udávající míru podobnosti jednotlivých odrůd. Kladogram můžeme rozdělit na dvě hlavní větve, které se dále člení podle koeficientu podobnosti. Jedna větev nám odlišila dvě odrůdy Slovenská krajová (6) a Opus (16), které jsou úplně jiné než zbývající členové sledované skupiny odrůd. Vzhledem k délce obou větví se i přesto dá říci, že odrůdy jsou si navzájem podobné.

Odrůdy 1-3 jsou registrované v 50. letech minulého století, u nichž nebyla zjištěna žádná informace o pravděpodobném původu, se od sebe příliš neliší. Jedná se o staré krajové odrůdy typu populace s vysokým stupněm cizosprášení, pocházející přibližně ze stejného území, v důsledku čehož mají širokou avšak podobnou genetickou základnu. Odrůda Česká



krajová (4) má také neznámý původ, ale díky svému jarnímu charakteru se od skupiny odrůd 1, 2 a 3 odlišuje a netvoří společně s nimi ani společný klast. Slovenská krajová s československým původem a další odrůdy s neznámým původem se od zbývajících liniových odrůd výrazně liší. Liniové odrůdy vznikají samosprašením za postupného ustálení linie, proto jsou od odrůd krajových velmi vzdálené. Vzhledem k různým rodičovským komponentům jsou si méně podobné i vzájemně samy mezi sebou.

Z německých odrůd se od ostatních odlišují odrůdy Rechbergs Winterraps (17) a WRG 19 (19). U odrůd Rechbergs Winterraps a WRG 19 je udáván původ německý, avšak nepodařilo se zjistit ani jejich přibližný rodokmen. Z výsledků PCO analýzy se dá usoudit, že mohly mít některé společné předky se starými československými a českými odrůdami, anebo je tato situace určována jejich širokou genetickou základnou, kterou jsou odrůdy typu populace charakteristické. Odrůdy Trend (27) a Senator (32) patří sice mezi jarní odrůdy řepky, ale nijak výrazně se od ostatních německých odrůd neliší.

Identifikace registrovaných odrůd, studium a charakterizace diverzity genových zdrojů a ověřování čistoty šlechtitelských linií a semen jsou hlavní pole působnosti molekulárních markerů v programech šlechtění řepky. Tudiž lepší znalosti o rozdělení donorových (dárcových) genů, genetických dispozic zemědělsky i ekonomicky výhodných důležitých znaků a dostupnost genetických zdrojů, výběrů a markerovacích systémů hraje velmi důležitou roli při použití technik molekulárního markerování a nových postupů při šlechtění kulturních rostlin. AFLP metoda je podle Powell *et al.* (1996) a Lombard *et al.* (2000) velmi užitečným nástrojem při identifikaci odrůd. Ve své práci porovnávali 83 odrůd jarních a ozimých odrůd řepky se sedmnácti kombinacemi AFLP primerů. Pro odlišení 83 odrůd jim stačilo použít dvě primerové kombinace. Pomocí těchto dvou primerových kombinací se jim podařilo rozlišit i odrůdy Eurol a Idol. Avšak Lee *et al.* (1996) neuvádí mezi zmiňovanými odrůdami žádné významnější rozdíly na základě svých dat získaných při testování těchto odrůd pomocí techniky RFLP. Oproti tomu Hu *et al.* (2006) hodnotili genetickou diverzitu u druhu *Brassica napus* pocházejících z Evropy a Číny podle devíti významných agronomických vlastností. Mezi vybrané agronomické vlastnosti byly zařazeny tyto: výška rostlin, počet větví při primárním větvení, poloha první primární větve, mezní délka květenství, počet šesulí na jedno květenství, počet šesulí na celou rostlinu, počet semen

v šesuli, hmotnost tisíce semen, výnos semen na jednu rostlinu. Na základě výsledků těchto vybraných agronomických vlastností zjistili, že se shodují s dostupnými informacemi o rodokmenu a geografickém původu posuzovaných odrůd, rovněž tomu tak bylo u jejich výsledků z předešlé studie pomocí RAPD analýzy. Oproti tomu se však jejich závěry neshodují se zjištěnými poznatky RFLP analýzy, kterou použili Song a Osborn (1992), Diers a Osborn (1994) a Lee *et al.* (1996).

Sebastian *et al.* (2000) se snažil o integraci AFLP a RFLP dat získaných při studiu druhu *Brassica oleracea* do genových map. Také Jones *et al.* (1997) i Sobotka *et al.* (2004) publikovali vyšší úroveň polymorfismu a vyšší rozlišovací schopnost při porovnávání metody AFLP s RAPD a SSR. Seyis *et al.* (2003) použil AFLP markerování k analýze genetické diverzity u řepky, kdy počet polymorfních lokusů na jednu analýzu je důležitým faktorem pro odrůdovou identifikaci.

Metoda AFLP byla kromě RFLP a RAPD porovnávána i s jinými technikami. Hale a Farnham (2005) porovnávali mezi sebou tři různé markery: SRAP, AFLP a SSR pro detekci genetických rozdílů v inbredních liniích u brokolice (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*). Pomocí AFLP se podařilo odhalit větší množství polymorfních míst a je tedy mnohem vhodnější pro rozlišení posuzovaných vzorků. I když se uvažuje pracnost, nákladnost metody a časová náročnost. AFLP v této práci poskytla 20 polymorfních pruhů na jednu primerovou kombinaci, naproti tomu SSR marker, kde je polymorfismus zachycen u dvou pruhů na primer a u SRAP je to 14 pruhů na primer.

Další použití této techniky je odlišování hybridů mezi druhem *Brassica napus* L., příbuznými planými druhy (Hansen *et al.*, 2001, 2003) a případně mezi transgenními rostlinami a jejich planými příbuznými (Warwick *et al.*, 2003). Ke *et al.* (2004, 2005) se pomocí AFLP pokusili o identifikaci rostlin spojenou s recesivní pylovou genovou sterilitou (RGMS). Janeja *et al.* (2003) použil AFLP pro identifikaci CMS hybridů. Je popsáno také využití techniky AFLP při identifikaci žlutosemenných řepok (Zhi-Wen *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007).

#### 4. Testování markeru pro rozlišení rostlin s různým obsahem kyseliny linolenové.

Úkolem 4. řešeného okruhu bylo testování vhodnosti použití RAPD markerů s primery OPB12 a OPB15 při rozlišování rostlin s vysokým standardním a sníženým obsahem kyseliny linolenové v oleji. Do testu byly zařazeny jednotlivé soubory rostlin, skládající se z 12 rodin vzniklých po vzájemném křížení rodiče se sníženým obsahem a rodiče se standardním obsahem. Testováno bylo 12 rodin označených písmeny A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M.

Byl stanoven interval pro obsah kyseliny linolenové 4,76 % - 6,99 % znamenalo nízký obsah (N), 7 % - 9,17 % odpovídalo vysokému obsahu (V).

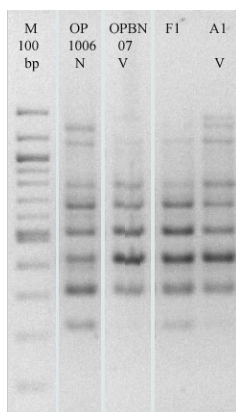
Na fotografiích elektroforegramů byla hodnocena spektra pruhů o velikosti 1300bp, 1100bp, 1000bp, 950bp, 800bp, 700bp, 500bp, 400bp, 300bp, 200bp. Byla vytvořena matice přítomnosti a nepřítomnosti pruhu a vyhodnocena programem MVSP.

#### Obrázky a komentáře k jednotlivým rodinám

Tab. č. 9 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny A

Rostlina	OP1006	OPBN07	F	A1
Obsah				
C18:3	-	-	-	7,49
V/N	N	V	-	V

Obr. č. 16 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu A, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.



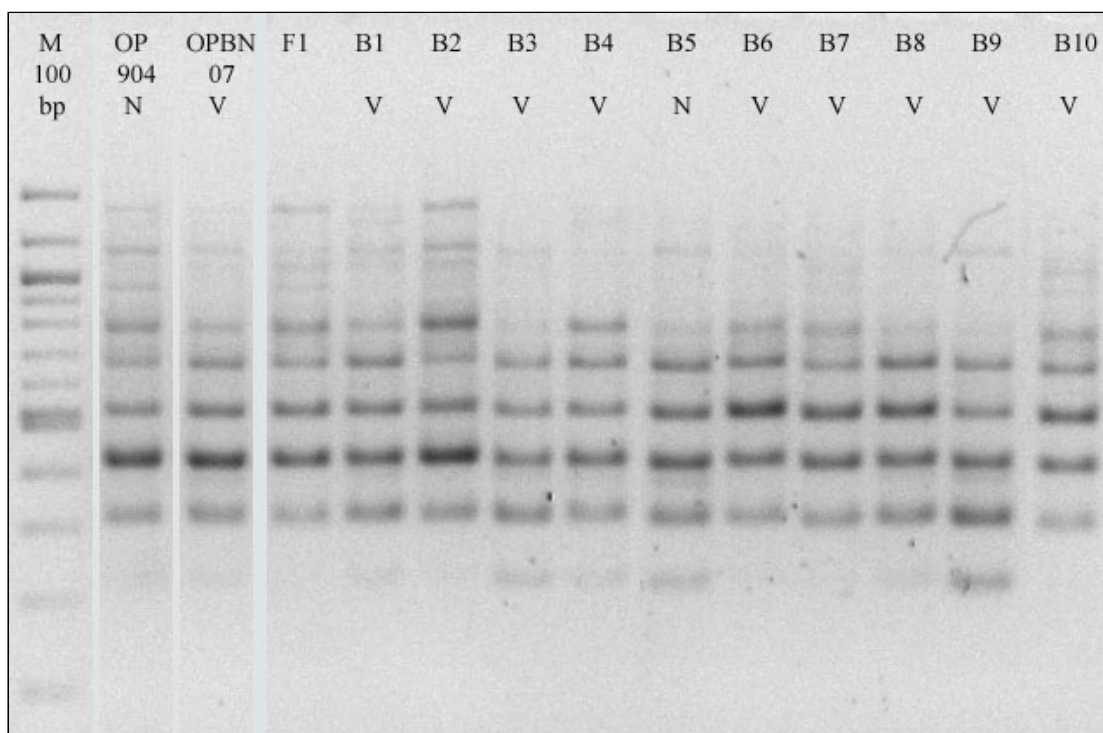
Při tak malém počtu jedinců v potomstvu se rodina zodpovědně hodnotit nedá. Můžeme jen konstatovat, že potomek má vyšší obsah kyseliny linolenové a spektrum pruhů je

stejně jako u rodiče s vyšším obsahem, což odpovídá i naměřené hodnotě obsahu kyseliny linolenové 7,49%, jediným rozdílem je tak pouze nižší intenzita pruhů 1300bp, 1100bp.

Tab. č. 10 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny B

Ro stli na	OP 904	OP BN 07	F	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B1 0
Ob sah C1				8,3	8,5	8,2	9,1	6,7	7,3	7,6	8,9	7,8	7,5
8:3	-	-	-	6	8	4	7	1	7	8	2	3	4
V/ N	N	V	-	V	V	V	V	N	V	V	V	V	V

Obr. č. 17 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu B, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

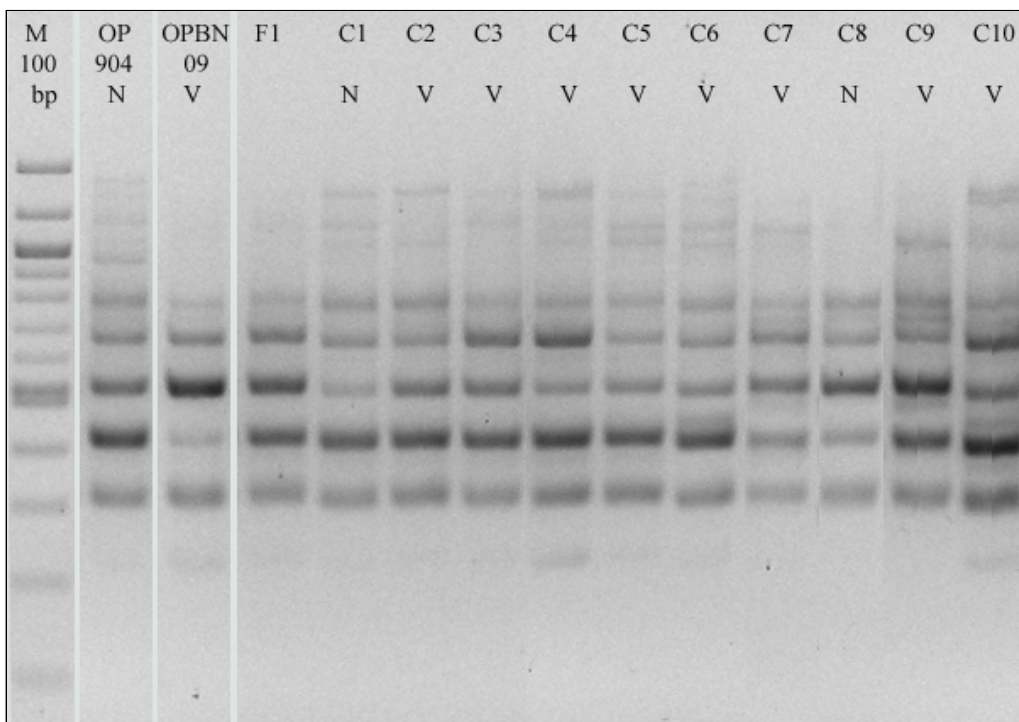


Rodina s celkově vyšším obsahem kyseliny linolenové. Všechny rostliny mají spektrum jako rodičovská rostlina s vyšším obsahem a to i rostlina B5. Ta však svým obsahem spadá již do druhé skupiny, ale i tam se blíží horní hranici intervalu.

Tab. č.11 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny C

Ro stli na	OP 904	OP BN 09	F	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C1 0
Ob sah													
C1 8:3	-	-	-	6,7	7,9 6	7,6 6	8,4 6	8,1 2	7,3 5		6,3 7	7,5 4	7,7 3
V/ N	N	V	-	N	V	V	V	V	V	V	N	V	V

Obr. č. 18 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu C, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.



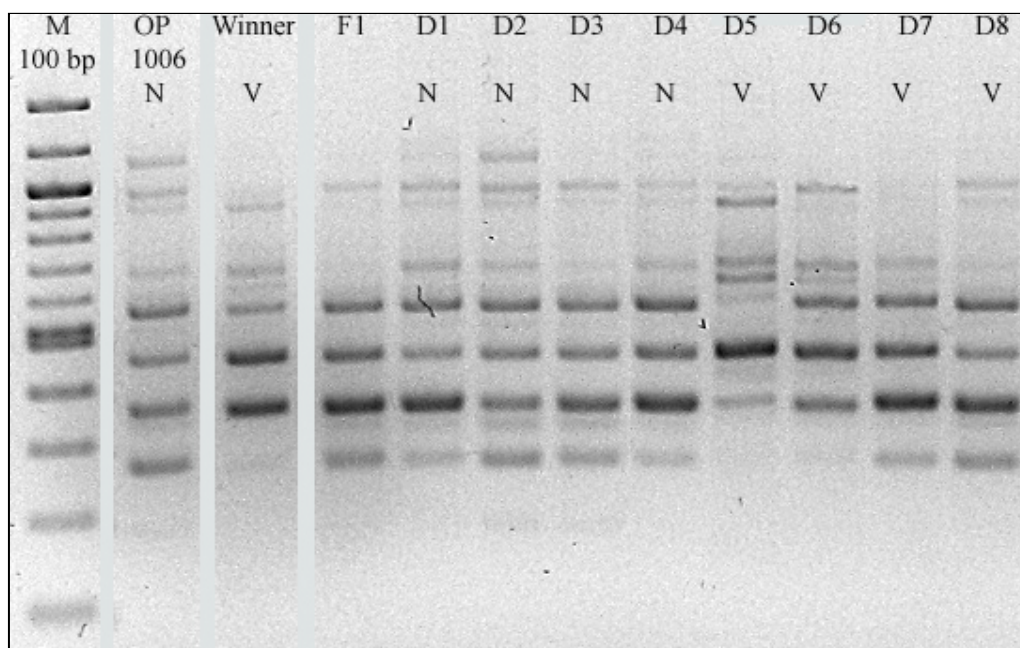
C1, C4, C6, C10 jako rodič s nízkým obsahem, ale pouze C1 má nízký obsah, i když i ten se spíše blíží horní hranici intervalu. C2, C3, C5, C7, C8 jako rodič s vysokým obsahem, ale C8 svým obsahem spadá do intervalu nízkého obsahu. C9 odlišné spektrum.

Tab. č. 12 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny D

Rostlina	OP 1006	Winner	F	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Obsah C18:3	-	-	-	6	6,02	6,	6,35	7,6	7,12	8,12

						4		9		
V/N	N	V	-	N	N	N	N	V	V	V

Obr. č. 19 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu D, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

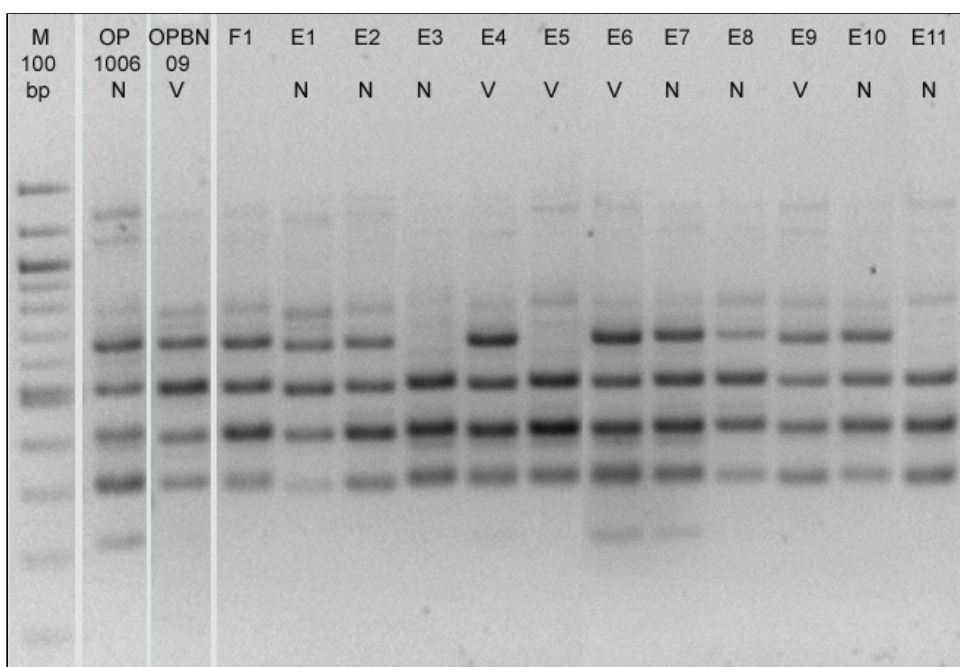


D1, D2, D4, D5 mají spektrum jako rodič s nízkým obsahem kyseliny linolenové, i když rostlina D5 má obsah 7,69% a řadí se ke kategorii s vysokým obsahem, oproti tomu rostlina D3, by se svým obsahem řadila do skupiny nízkoobsažných, ale spektrum pruhů tomuto stavu neodpovídá, D6, D7, D8 už ano, mají spektrum pruhů stejně jako rodič s vyšším obsahem.

Tab. č. 13 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny E

Rostlina	OP 1006	OP- BN-09	F	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
Obsah C18:3	-	-	-	5,37	5,2	5,67	8,07	8,87	9,07	5,07	6,07	7,24	6,37	6,05
V/N	V	N	-	N	N	N	V	V	V	N	N	V	N	N

Obr. č. 20 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu E, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.



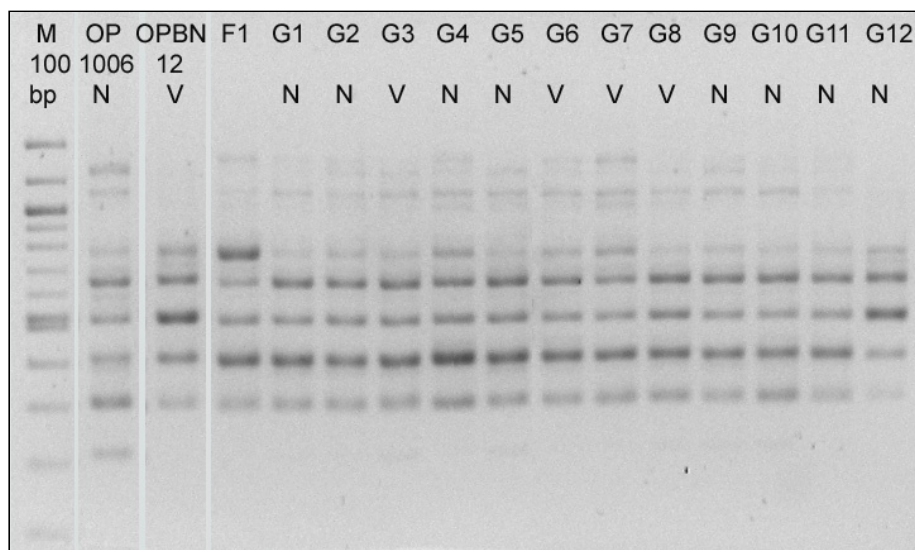
E6, E7, jako rodič s nízkým obsahem, kdy E6 má výrazně vysoký obsah přes 9%, ale spektrum pruhů stejné jako sesterská rostlina, E1, E2, E4, E8, E9, E10 jako rodič s vysokým obsahem kyseliny linolenové, E3, E5, E11 jiné spektrum, odlišné jednak od rodičovských, ale i sesterských rostlin.



Tab. č. 14 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny G

Rostlina	OP 1006	OP- BN-12	F	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
Obsah C18:3	-	-	-	6,71	6,37	7,13	6,74	6,8	7,38	7	7,89	6,54	6,4	5,54	5,5
V/N	V	N	-	N	N	V	N	N	N	V	V	N	N	N	N

Obr. č. 21 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu G, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

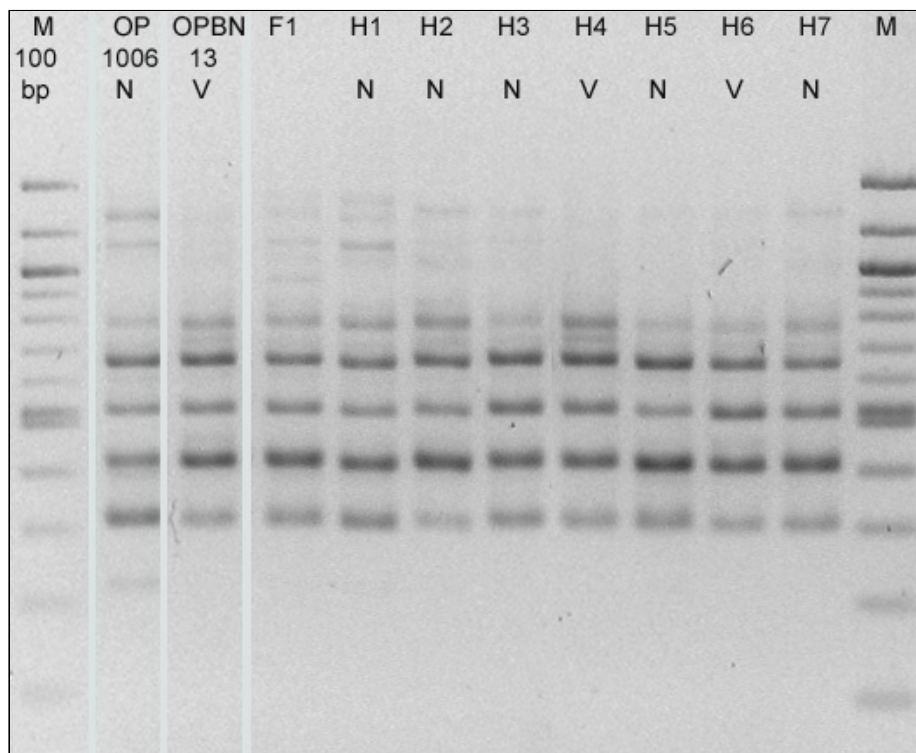


G3, G5, G10 spektrum pruhů jako rodič s nízkým obsahem, avšak G3 má obsah mírně nad průměrný. G11, G12 vykazuje spektrum pruhů jako rodič s vysokým obsahem, ale faktický obsah k. linolenové je v obou případech nízký. U vzorků G1, G2, G4, G6, G7, G8, G9 se opět objevuje jiné spektrum než u rodičovských jedinců.

Tab. č. 15 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny H

Rostlina	OP 1006	OP-BN-13	F	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Obsah				5,8		6,6			8,2	5,
C18:3	-	-	-	8	4,76	5	7,44	5,54	1	68
V/N	V	N	-	N	N	N	V	N	V	N

Obr. č. 22 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu H, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

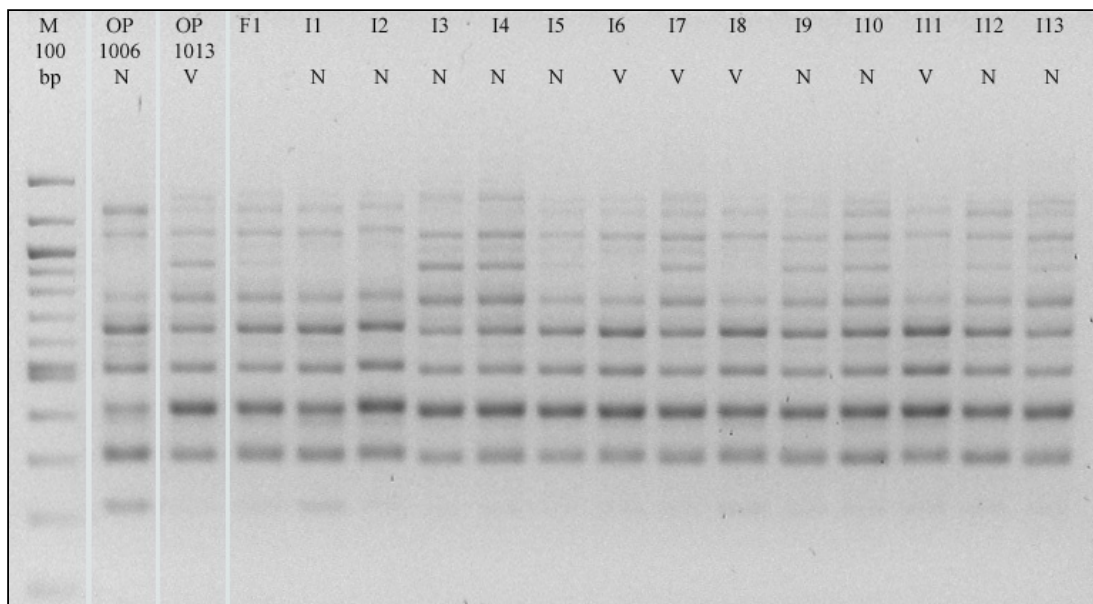


Spektrum pruhů, které se objevuje u rodiče s nízkým obsahem, se nevyskytlo u žádného ze vzorků, i když se zde převážně objevují vzorky takto určené, H4, H5, H6 jako rodič s vysokým obsahem, H1, H2, H3, F7 jiné spektrum.

Tab. č. 16 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny I

Rostlina	OP	OP-	F	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13
Obsah	1006	1013														
C18:3	-	-	-	5,56	6,14	5,99	6,97	6,8	8,26	7,21	7,81	6,95	6,6	8,35	6,7	5,92
V/N	V	N	-	N	N	N	N	N	V	V	V	N	N	V	N	N

Obr. č. 23 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu I, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

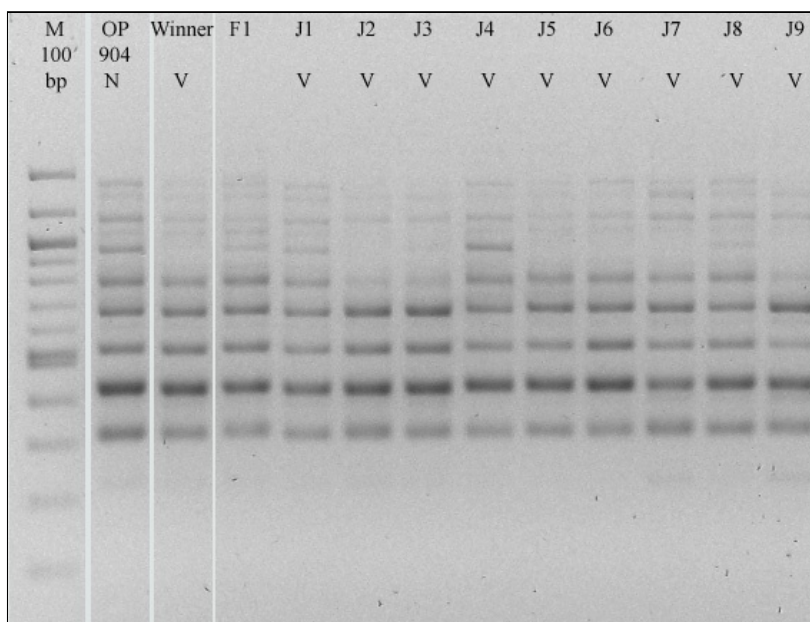


I1, I2, I8, I9 spektrum pruhů jako rodič s nízkým obsahem, ale ve výčtu chybí několik dalších, které by se do této skupiny podle svého obsahu hodily, avšak nachází se ve druhé skupině. I3, I4, I5, I7, I9, I10, I11, I12 jako rodič s vyšším obsahem, I6, I8 jiné spektrum.

Tab. č. 17 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny J

Rostlina	OP 904	Winner	F	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9
Obsah				8,2		8,8		8,3	8,9		9,6	8,0
C18:3	-	-	-	2	7,56	6	7,74	6	2	8	6	3
V/N	V	N	-	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Obr. č. 24 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu J, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

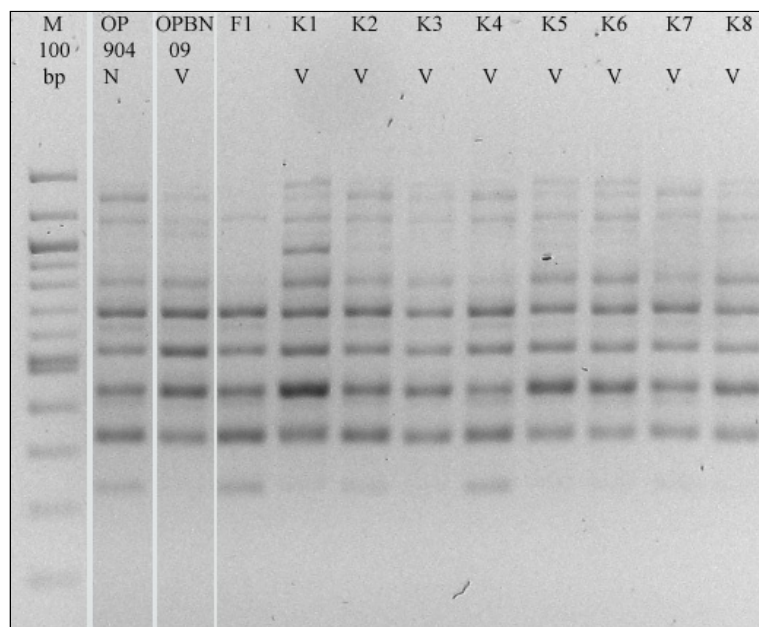


Celá skupina se vyznačuje celkově vysokým obsahem kyseliny linolenové, který dosahuje nadprůměrných hodnot, přesto se tu však objevily dvě rostliny J1 a J4, které by se podle spektra pruhů řadily k rodiči s nízkým obsahem.

Tab. č. 18 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny K

Rostlina	OP 904	OP-BN-09	F	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Obsah									8,8		7,9
C18:3	-	-	-	7,36	7,11	8,23	8,4	7,58	7	7,76	9
V/N	V	N	-	V	V	V	V	V	V	V	V

Obr. č. 25 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu K, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.

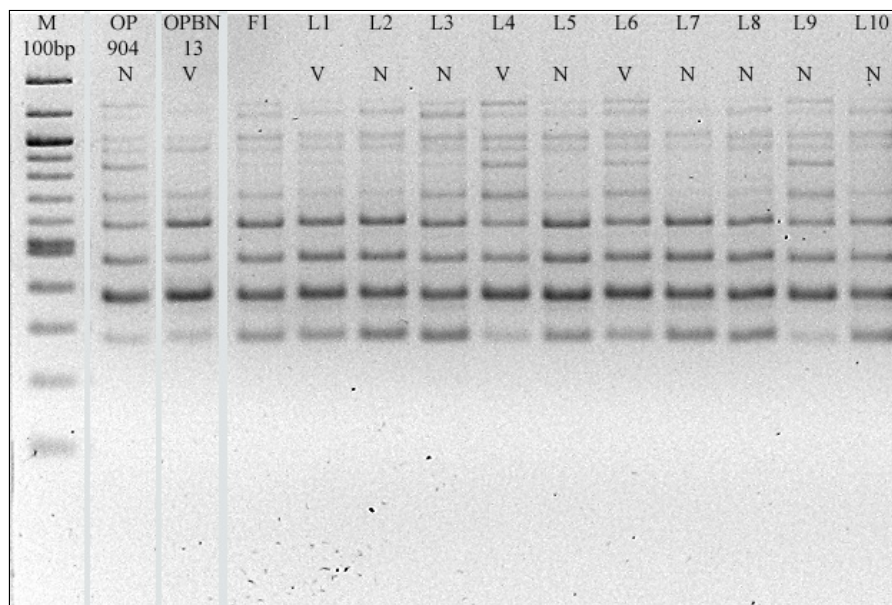


Skupina K obsahuje opět pouze jedince s vyšším obsahem kyseliny linolenové, K1, K2, K4 mají spektrum pruhů jako rodič s nízkým obsahem, K3, K5, K6, K7, K8 jako rodič s vyšším obsahem.

Tab. č. 19 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny L

Rostlina	OP 904	OP-BN-13	F	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
Obsah					6,9	6,2		6,	7,9		6,6	6,1	
C18:3	-	-	-	7,41	2	4	8,32	5	5	6,83	5	4	6,66
V/N	V	N	-	V	N	N	V	N	V	N	N	N	N

Obr. č. 26 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu L, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.



L1, L2, L3, L4, L6, L9, L10 vykazují spektrum stejné jako rodič s nízkým obsahem, ale svým obsahem se mezi nízkoobsažné řadí pouze L2, L3, L9 a L10. Jako rodič s vyšším obsahem se jeví vzorky L5, L7, L8, ale všechny mají obsah spíše nižší pohybující se mírně pod hranicí intervalu.

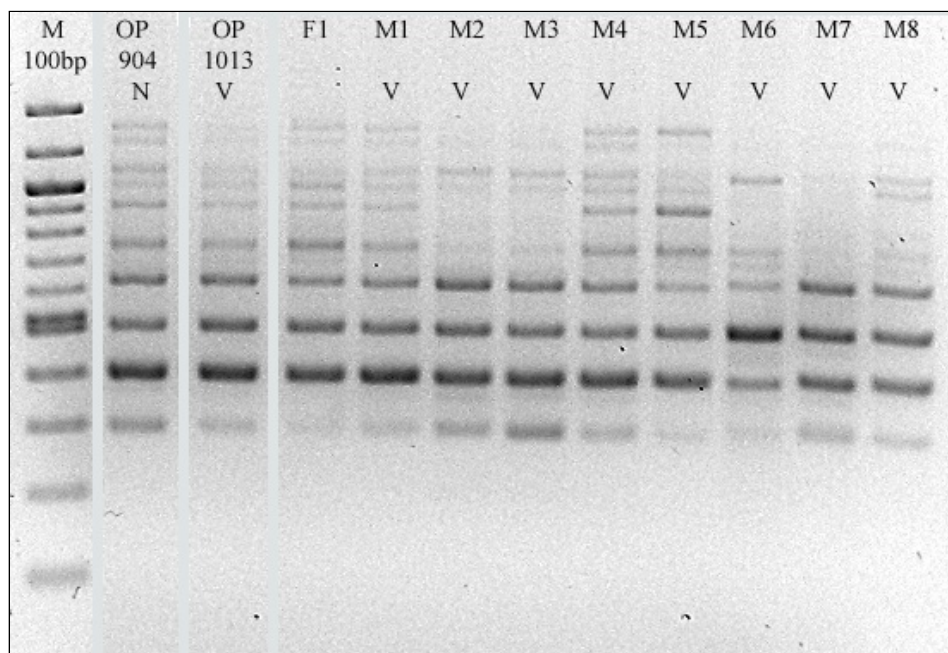
Tab. č. 20 Obsah kyseliny linolenové v oleji (%) u rostlin rodiny M

Rostlina	OP 904	OP-1013	F	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Obsah				7,0		7,9	8,7		7,6	8,5	
C18:3	-	-	-	6	8,26	9	8	8,54	4	1	7,91



V/N	V	N	-	V	V	V	V	V	V	V	V	V
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

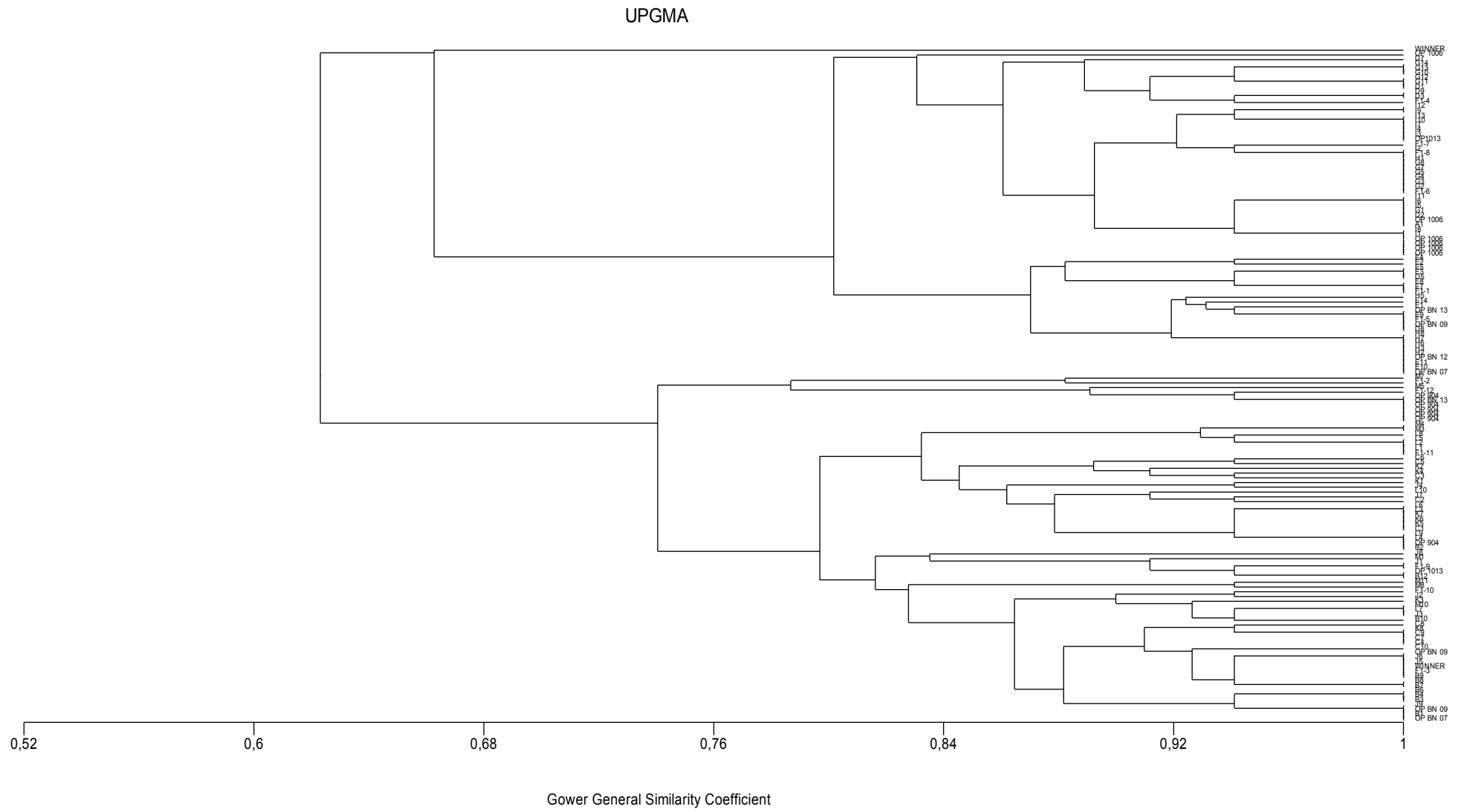
Obr. č. 27 Výsledek RAPD analýzy s primerem B12 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu M, sledované spektrum pruhů je v zóně 200 – 1300 bp.



Na první pohled mají oba rodiče stejné spektrum, tudíž je tato skupina nehodnotitelná a tento primer se pro ni nehodí. V potomstvu se však nachází rozdíly, ale vzhledem k tomu, že jsou všechny vzorky zařazeny do skupiny s vyšším obsahem, nemáme rozhodující porovnání.

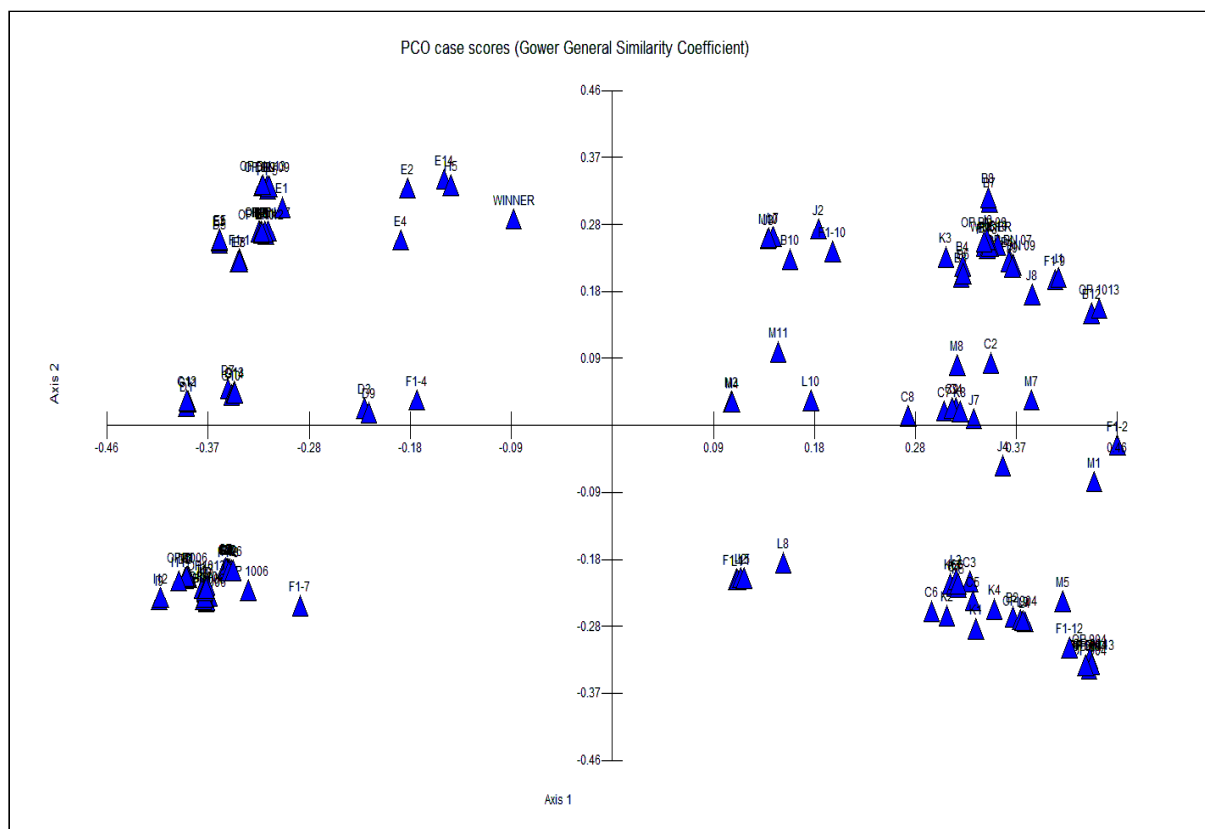
Ne všechny rostliny v souboru mají stejnou diverzitu kyseliny linolenové. Rozpětí množství v obsahu kyseliny linolenové se pohybuje od 2%- 20% v intervalech (2-4(4-8)8-12,12-20%).

Obr. č. 28 Výsledky analýzy UPGMA RAPD dat. Jsou patrné dvě hlavní skupiny jedinců pocházející z křížení dvou rodičovských linií OP1006 a OP 904.



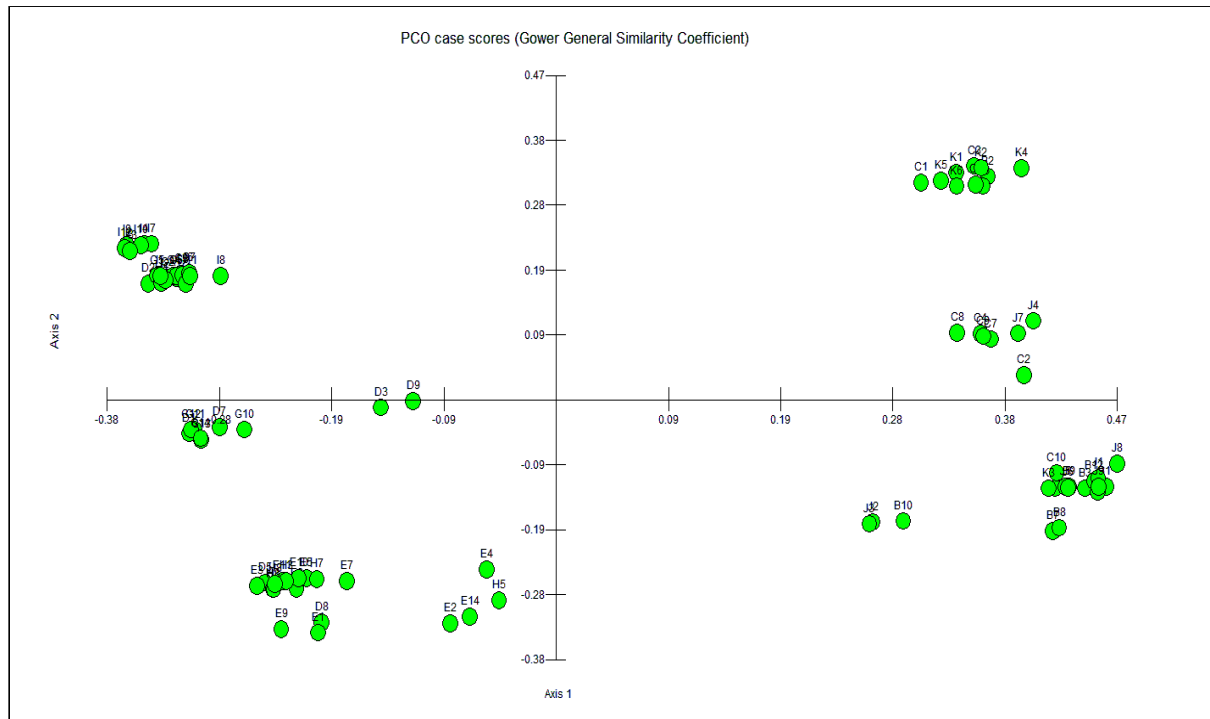
Z obrázku č. 28 je patrné rozdělení na dva hlavní klastry, což je logické, neboť pro křížení byly použity dvě rodičovské rostliny se sníženým obsahem kyseliny linolenové OP 1006 a OP 904, na které jsou postupně nakřížovány další odrůdy a perspektivní šlechtitelské materiály s vynikajícími vlastnostmi. Z dalšího rozdělení je patrná určitá diferenciace do skupin, které do určité míry kopírují rodinové uspořádání, které se nám přenáší i do následujícího obrázku č. 28.

**Obr. č. 29** Výsledek PCO analýzy RAPD, při analýze vzniklo 11 skupin jedinců odpovídající téměř zástupcům jednotlivých rodin.



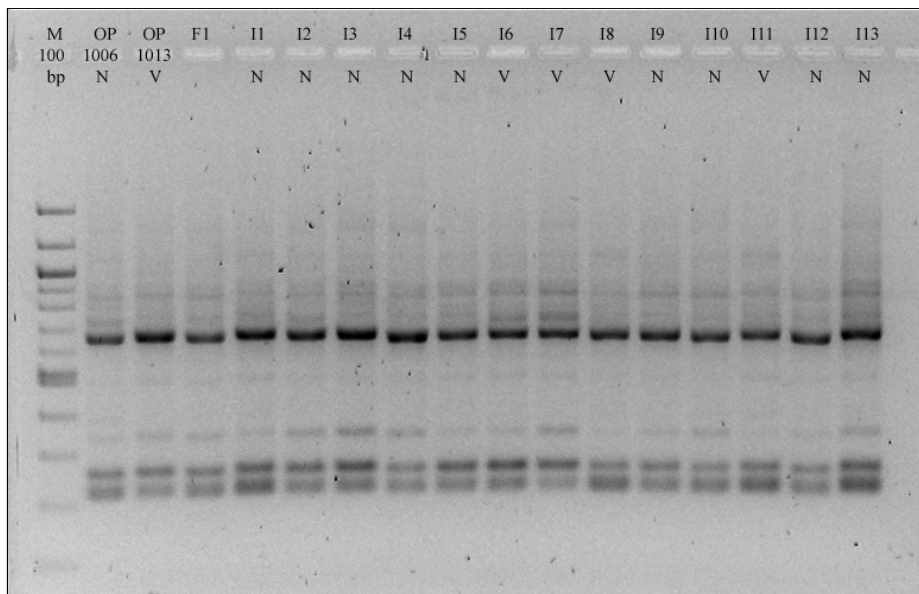
Na obr. č. 29 je patrných 11 skupin rostlin, které v převážné většině neodpovídají zastoupení jedinců v jednotlivých rodinách. Proto se při dalším porovnávání výsledků přistoupilo i k PCO analýze, která sdužovala RAPD výsledky se získanými obsahy kyseliny linolenové v % viz obr. č. 30. PCO analýza sdužených dat (RAPD a obsahů kyseliny linolenové) nám rozdělila soubor testovaných rostlin na 9 skupin, ale ani při tomto rozdělení nebyla zjištěna uspokojivá data.

**Obr. č. 30** Výsledek PCO analýzy sdružených dat z RAPD a obsahů kys. linolenové jednotlivých rostlin



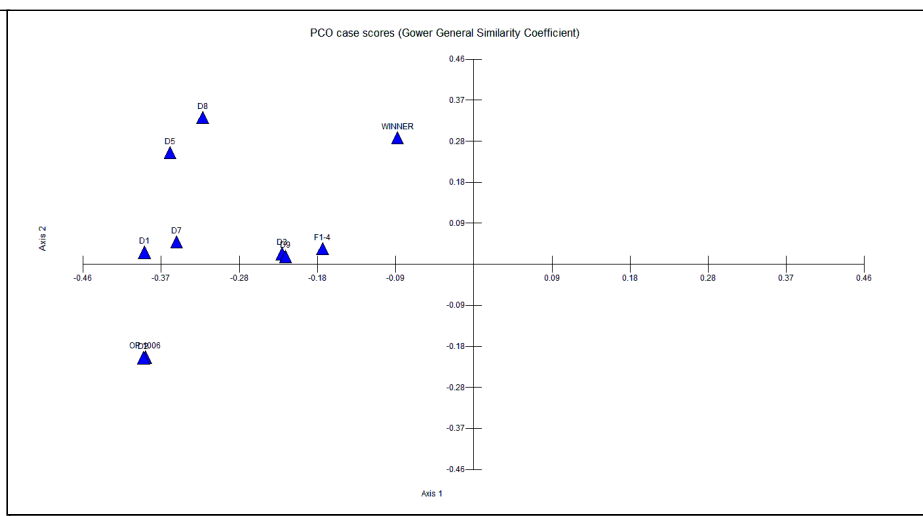
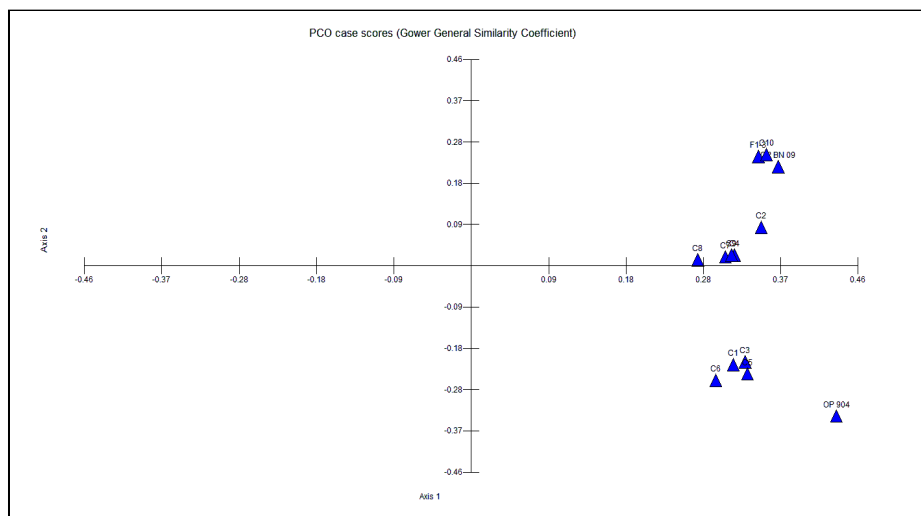
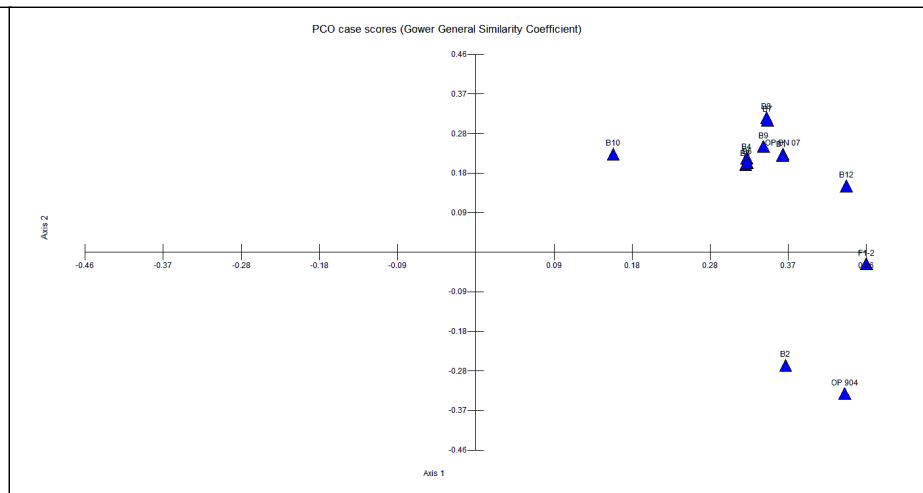
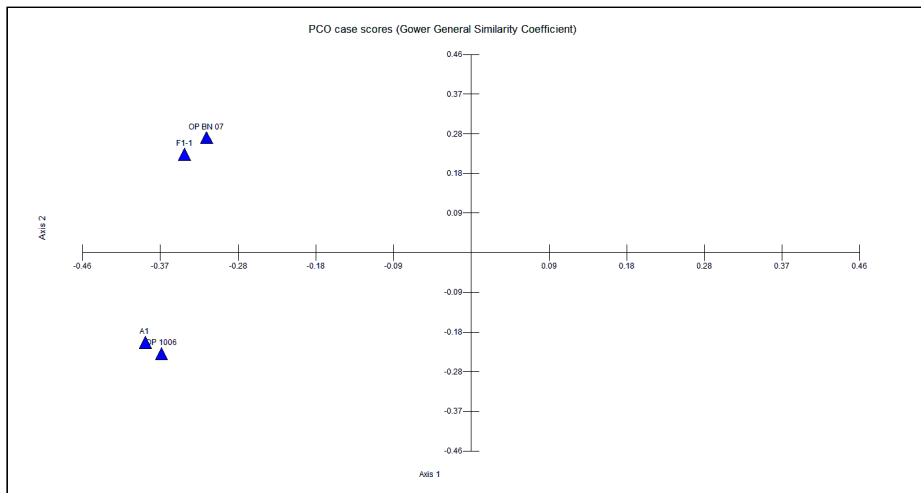
Dvě hlavní skupiny podle rodičovských komponent nesoucí znak sníženého obsahu k linolenové, potomstvo linie OP 1006 na levé straně a potomstvo OP 904 na pravé.

**Obr. č. 31** Výsledek RAPD analýzy s primerem B15 pro účely hodnocení segregace znaku zastoupení mastných kyselin pro rodinu I, sledované spektrum pruhů je v zóně 200-700bp.

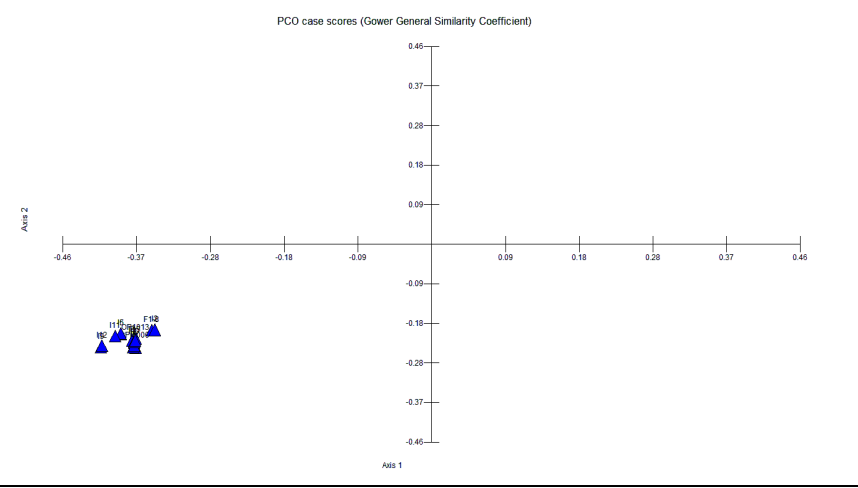
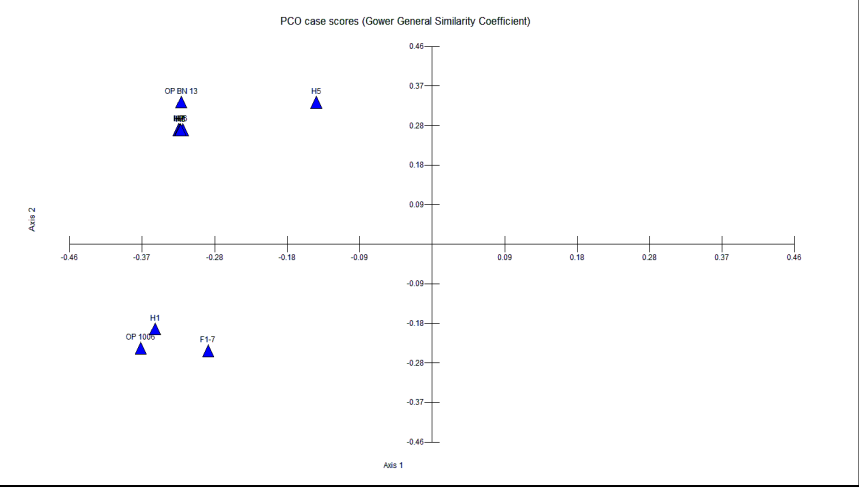
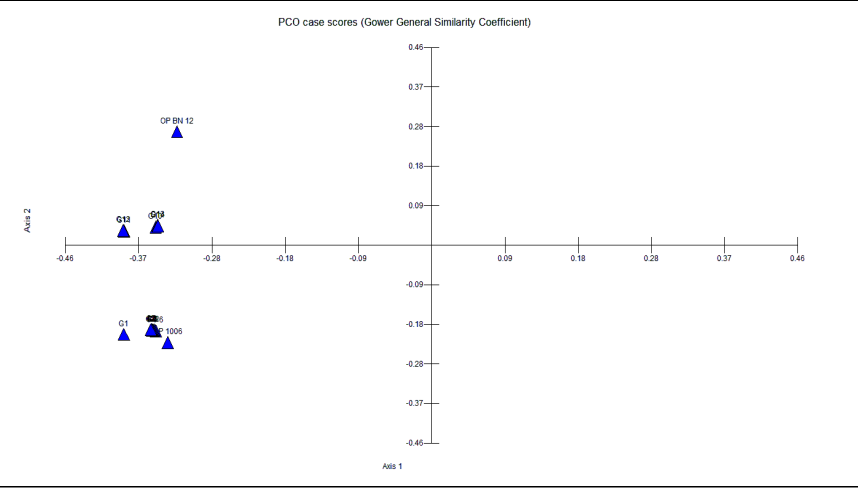
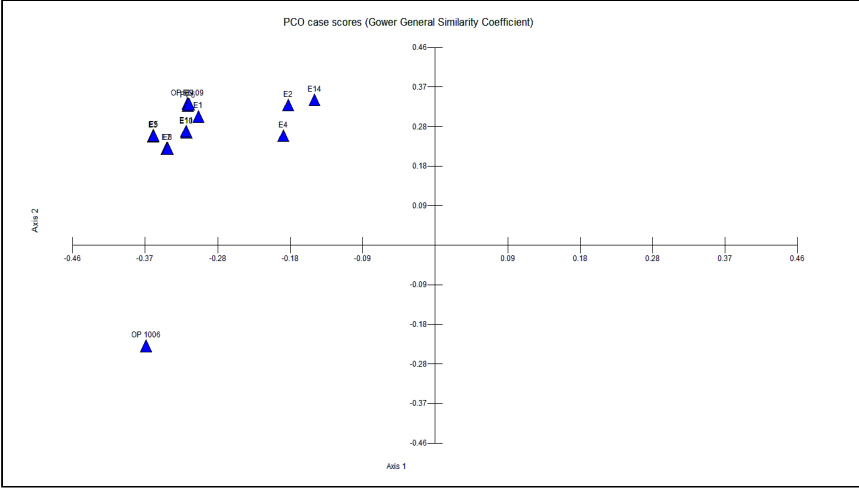


RAPD analýza s tímto primerem B15 (obr. č. 31) neposkytovala dostatečnou variabilitu potřebnou pro hodnocení, a proto se její výsledky nehodnotily.

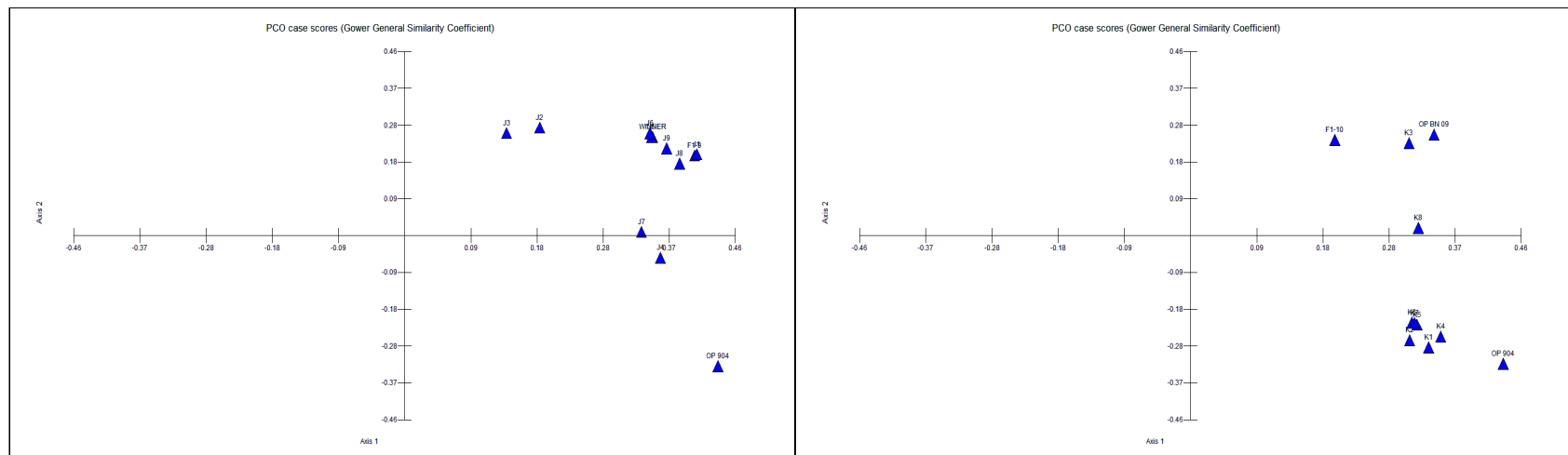
Obr. č. 32 Výsledky PCO analýzy RAPD dat pro jednotlivé rodiny A, B, C, D



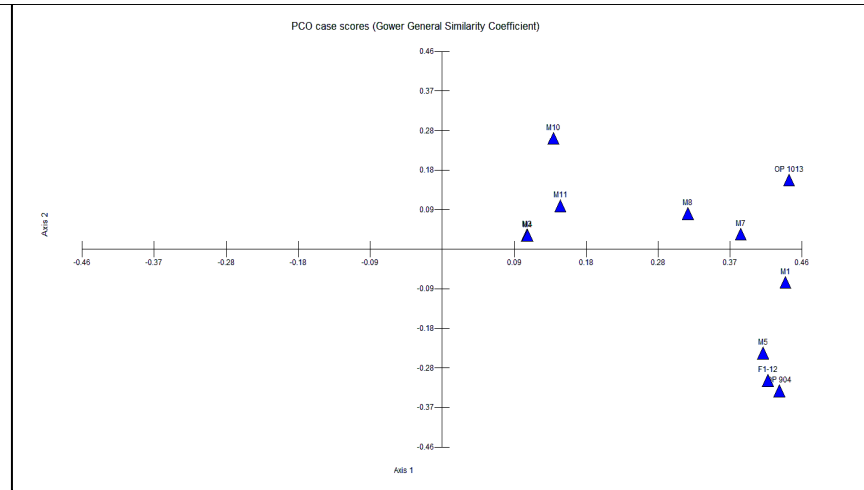
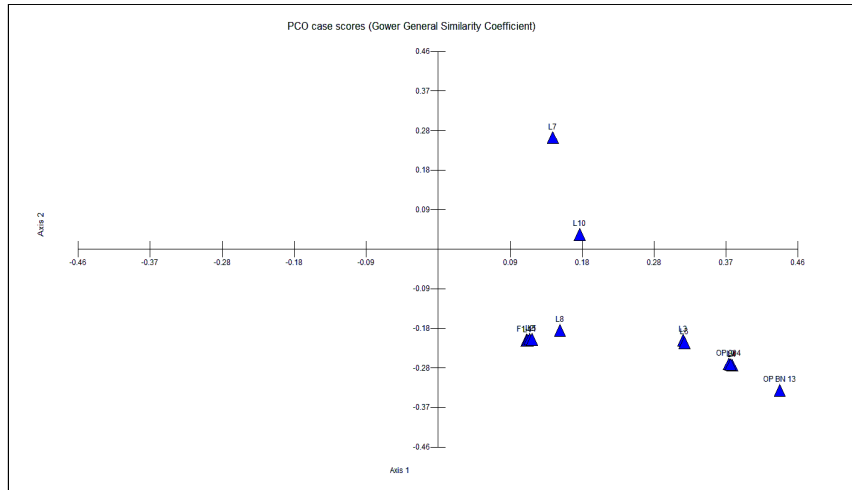
Obr. č. 33 Výsledky PCO analýzy RAPD dat pro jednotlivé rodiny E, G, H, I



Obr. č. 34 Výsledky PCO analýzy RAPD dat pro jednotlivé rodiny J, K, L, M







Z obrázku č. 32-34 je patrné, že primer OPB 15 se pro účely identifikace rostlin s nízkým obsahem kyseliny linolenové u sledovaných rodin nehodí.

Pomocí primerů OPB 12 a OPB 15 se tedy nepodařilo odlišit rostliny s vyšším a se sníženým obsahem kyseliny linolenové.

Při podrobném zkoumání PCO analýza z RAPD dat nebyly zaznamenány žádné uspokojivé výsledky, které by podpořily využití testovaných primerů OPB 12 a OPB 15 při analýzách souborů rostlin s takto nízkou diverzitou v obsahu kyseliny linolenové.

Primer OPB 12 by se tudíž v tomto případě dal s úspěchem použít pouze jako marker, který by rozlišil potomstvo těchto rodičovských komponent OP 904 na straně jedné a OP 1006 na straně druhé.

C a K rodiny pochází navíc ze stejné kombinace křížení rodičovských komponentů OP 904 a OP BN 09, avšak s vyměněnými pozicemi mateřské a otcovské rostliny. Proto se asi nachází ve skupině většina K a některá C, i když ta jsou pak i v dalších.

Obsah a kvalita oleje v semenech řepky jsou jedny z hlavních kritérií výběru nových odrůd. Nicméně akumulace oleje v semenech je komplikovaný proces jak metabolicky tak geneticky (Zhao *et al.*, 2011). Na složení mastných kyselin v oleji mají vliv také teplota prostředí a výživa dusíkem (Baux *et al.*, 2011). Jako HO (high oleic) linie jsou popsány materiály s obsahem kyseliny olejové okolo 79,5 % a LL (low linolenic) zase linie s obsahem kyseliny linolenové okolo 2,1%. Tyto materiály byly získány chemickými mutacemi ethyl metasulfonátem a posléze byly od těchto mutantů odvozeny linie (Spasibionek *et al.*, 2011). Poměr kyselin olejové a linolenové byl sledován i u dalších brukvovitých, např. u rodu *Arabidopsis* je v současnosti popsáno několik stovek genů účastnících se metabolické dráhy mastných kyselin. Také u řepky již byla identifikována řada QTL pro hodnocení obsahu oleje, ale kvalitní mapa a popřípadě mapa založená na jejich klonování ještě nebyla publikována (Zhao *et al.*, 2011).

Ale již v roce 1995 Tanhuanpää *et al.* (1995) zveřejnili asociace mezi RFLP a RAPD markery na straně jedné a obsahem kyseliny linolenové na straně druhé. V testu použil 8

RFLP markerů a 34 RAPD, spolehlivé výsledky poskytl RAPD marker 25a, který nachází odezvu při zkoumání obsahu kyseliny linolenové různých rostlin. V roce 2002 Tanhuanpää a Schulman rozšířili spektrum primerů použitelných při molekulárních analýzách hledajících alelově specifické markery. Nalezli 27 RAPD markerů pro *fad3* gen, které zároveň mohou být použity také při marker asistované selekci. Žaludová (2007) hledala markery, které by rozlišily rostliny se sníženým obsahem kyseliny linolenové v rámci souboru rostlin pocházejících ze šlechtitelských materiálů. Vybrala dva RAPD markery pocházející z Operonové řady primerů OPB12 a OBP15, pro testování diverzity rostlin v obsahu kyseliny linolenové. Pomocí primeru OPB15 se jí podařilo částečně rozlišit rostliny se sníženým a standardním obsahem. My jsme se pokusili ověřit použití těchto primerů v rámci nového souboru rostlin, rozděleného na 12 rodin. Zatímco u Žaludové (2007) se primer OPB15 osvědčil jako marker, na námi použitým souboru rostlin zklamal. Spektrum fragmentů na agarosovém gelu neposkytlo žádnou spojitost s výší obsahu kyseliny linolenové. U našeho souboru testovaných rostlin tento primer nevykazoval žádnou diverzitu. Primer OPB 12 se sice Žaludové (2007) jevil jako slabší marker, v našem případě poskytl odlišná spektra fragmentů. Ale při dalším zkoumání výsledků, bylo zjištěno, že se nedají spolehlivě odlišit rostliny se standardním a sníženým obsahem kyseliny linolenové.

Na poměrně vysokou podobnost šlechtitelských linií poukazují i výsledky sekvenačních analýz genu *fad3* (gen řídící syntézu enzymů zapojených do biosyntézy mastných kyselin, kóduje desaturázu a řídí tak syntézu kyseliny linolenové u rodičovských linií lišících se v obsahu této mastné kyseliny).

Roslinski a Falk (2011) publikovali výsledky zkoumání *fad 2* genu a jeho podílu na obsahu oleje u druhu *Brassica juncea*. Interspecifickou hybridizací a následným několikanásobným backcrosssem získali materiály s nízkým obsahem kyseliny erukové. Dále se u vzniklých linií zaměřili na studium *fad 2* genu majícím vliv na obsah mastných kyselin a tím i získání kvalitního oleje srovnatelného s řepkovým. Identifikovali několik alel tohoto genu a zjistili, že alela FAD2B je přítomna ve vzorcích s nižším a středním obsahem (do 55%) kyseliny olejové, ale nenachází se u jedinců s vysokým obsahem (nad 55%). Další testování dihaploidní populace ukázalo chybějící dlouhý fragment obsahující tuto alelu. Tato delece byla následně zjištěna v distální části chromozomu J11.



## 8. Závěr

Shrnutí práce je uvedeno v následujících bodech, podle hlavních cílů, kterým je tato práce věnována.

### Výsledky markerování se týkaly čtyř hlavních okruhů:

- 1) Výsledky prvního okruhu potvrzují možnost využití některých molekulárních markerů k selekci AI/AK rostlin používaných v průběhu šlechtění. Molekulární marker pro detekci genu *SLG I* byl s úspěchem využit k selekci AI rostlin a eliminaci nežádoucích AK rostlin, již na úrovni klíčnicích rostlin. Zjištěná účinnost selekčního markeru přes 80%, je více než uspokojivá z pohledu potřeb šlechtitele. Při porovnání s výsledky semenného testu provedeného ve VÚOL v Opavě, který ukazuje aktuální stav rostliny, se jeví jako výhodnější zejména z hlediska možnosti časné selekce v rané růstové fázi na úrovni klíčnicích rostlin. Zatímco na výsledky semenného testu musíme čekat na konec vegetačního období. Nevýhodou používání molekulárního markeru je ale jeho ovlivnění inhibičními a modifikačními geny, které se výrazněji projevují v dalších generacích po křížení.
- 2) Analýza souboru starých krajových odrůd získaných z genové banky, potvrdila prvotní domněnky o vyšší variabilitě genu *SLG I* u odrůd typu populace. Zajímavé je, že se tato variabilita, i když v menší míře vyskytuje i u odrůd novějších. Předpokládalo se, že zde přítomná pouze nefunkční alela A10, ale ukazuje se, že odrůdy mohou obsahovat i další nefunkční alely. Bylo by vhodné zaměřit se na bližší studium těchto zdrojů nových alel a na jejich možné využití v praktickém šlechtění hybridních odrůd. Neboť je vhodnější použití odrůd již s určitým stupněm prošlechtění a zejména vyšší kvality oleje, než hledání nových zdrojů s požadovanými vlastnostmi u resyntetizovaných materiálů nebo planých druhů, kde je skladba mastných kyselin naprosto nevyhovující současným potřebám a bylo by velmi náročné a jistě dlouhodobě tuto kvalitu opět získat.
- 3) Na základě AFLP studie příbuznosti testovaných odrůd bylo zjištěno, že české a německé šlechtění se dlouhá léta vzájemně ovlivňovalo a je znát, že zejména zpočátku pracovalo s velmi podobným materiálem. Je to pravděpodobně způsobeno i charakterem starých odrůd se širokou genetickou základnou. S postupem času je u německého způsobu zušlechťování řepky patrný odklon od tradičního směru šlechtění. Tento posun může být způsoben i využitím a zapojením nových genových zdrojů do systému tvorby odrůd. Zatímco na českém šlechtění je patrná dlouhodobá stagnace vývoje nových odrůd a není zde zaznamenán téměř žádný posun. Bylo by vhodné získat vhodné genové zdroje pro oživení současného stavu.
- 4) Při testování markerů pro vyšší obsahu kyseliny linolenové v rámci souboru šlechtitelských materiálů, byly cíleně plněny požadavky šlechtitelů na získání spolehlivého markeru pro tento znak. Bylo zjištěno, že výsledky neodpovídají předpokladům, především proto, že dosud v ČR nebyly nalezeny zdroje dostatečně nízkého obsahu kyseliny linolenové, jejichž obsah by se pohyboval na úrovni 2-3%. Na souboru málo kontrastních rostlin je téměř nemožné vysledovat nějaké zákonitosti. Obzvláště u znaků ve velké míře ovlivňovaných podmínkami prostředí jako je tomu u obsahu kyseliny linolenové. Odvození molekulárních markerů pro hodnocení kvality oleje řepky – markerování nízkého či vysokého obsahu kyseliny linolenové je dalším příkladem využití metod molekulárního markerování ve šlechtění řepky. Pro ověřování účinnosti vyvinutého markeru byla použita série „rodin“ – rodičovské komponenty, F1 hybridy a F2 populace po křížení genotypů s rozdílnými obsahy mastných kyselin v oleji semen. Tato křížení byla provedena ve VÚOL v Opavě, semena jednotlivých generací poskytl pro molekulární analýzy Ing. R. Koprna, PhD. Screening markerů byl proveden v předchozích letech v rámci řešení projektů. U všech analyzovaných jedinců byla k dispozici i data o kvalitě (obsah GSL, obsah mastných kyselin - olejové C18:1, linolové C18:2 a linolenové

C18:3) získaná na základě standardních chemických analýz. Určitým nedostatkem, který se ukázal jako limitující při hodnocení molekulárních markerů je poměrně nízký rozsah v obsahu jednotlivých mastných kyselin a tedy i poměrně úzká genetická základna prověřovaných materiálů, např. obsah kyseliny linolenové se pohyboval v rozsahu 4,76 % – 9,17 %. V celém souboru, u jednotlivých kombinací křížení byl podstatně užší 5,4 - 8,0%, u některých souborů se nevyskytoval ani žádný jedinec se sníženým obsahem kyseliny linolenové podle námi stanoveného intervalu (rodiny A, J, K, M). Použitý molekulární marker a jeho vypovídací schopnost je vázána na šlechtitelskou populaci – v případě dostatečného rozsahu fenotypové variability lze získat markery, které s vysokou pravděpodobností odliší jedince s požadovanými vlastnostmi a pomohou vyselektovat nevyhovující jedince, kteří by nevhodnou skladbu mastných kyselin přenášeli na potomstvo. V případě takto úzké genetické základny a malého rozsahu diverzity se projevil výraznější vliv použité kombinace křížení a „rodinová“ závislost markeru. V některých populacích s malým rozsahem variability sledovaného znaku (kombinace křížení OP-904 x Winner, OP-904 x OP-BN-09, OP-904 x OP-BN-13, OP-904 x OP-1013) se nepodařilo odlišit F2 rostliny vykazující „nízký“ a „vysoký“ obsah kyseliny linolenové. Dobrá markerovací schopnost a vysoká shoda segregace markeru a fenotypu obsahu kyseliny linolenové byla prokázána u kombinace křížení OP-BN-09 x OP-904.







## 9. Seznam použitých zkratek

AFLP – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

AG – agarózový gel

AI – autoinkompatibilita, autoinkompatibilní reakce

AK – autokompatibilita, autokompatibilní reakce

CMS – cytoplasmatická pylová sterilita

DUS - Distinctness Uniformity Stability

ISTA – International Seed Testing Association

MVSP – Multi-Variate Statistical Package (Kovach Comp. Serv)

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PAGE – polyakrylamidový gel

PCO - Principal Coordinates Analysis

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR-RFLP(syn.CAPS) – polymorfismus délky restriktivně štěpené amplifikované DNA

RFLP – polymorfismus délky restriktivních fragmentů

SCR – *S*-lokus cystein rich protein

SLG – *S* locus glycoprotein

SP11 – alternativní označení genu SCR

**SRAP – Sequence Related Amplified Polymorphism**

SRK – *S* receptor kinase

SSR - Simple Sequence Repeats

UPGMA - Unweighted pair group method averages

UPOV – International Union for the Protection of new Varieties of plants

ÚKZÚZ - Ústřední Kontrolní a Zkušební Ústav Zemědělský

## 10. Seznam použité literatury

- Ainsworth, C. C. and Sharp, P. J. (1989). The potential role of DNA probes in plant variety protection. *Plant Varieties and Seeds* 2, 27-3.
- Akbar M.A. (1989): Resynthesis of *Brassica napus* aiming for improved earliness and carried out by different approaches. - *Hereditas* 111: 239 - 246.
- Alphey, L. (1997). DNA Sequencing (Introduction to Biotechniques). Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Arús, P. (1983). Genetic purity of commercial seed lots. In „Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A“ (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.), pp. 415-423. Elsevier Science Publication, Amsterdam, Oxford, New York.
- Arús, P. and Shields, C. R. (1983). Cole crops (*Brassica oleracea* L.). In „Isozymes in Plant Genetics and Breeding, part B (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.), pp. 339-350. Elsevier Science Publication, Amsterdam, Oxford, New York.
- Arús, P., Tanksley, S. D., Orton, T. J. and Jones, R. A. (1982). Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 31, 417-428.
- Arús, P. and Shields, C. R., Orton, T. J. (1985). Application of isozyme electrophoresis for purity testing a cultivar identification of F1 hybrids of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 34, 651-657.
- Arús, P., Chevre, A. M., Delourme, R., Eber, F., Kerlan, M. C., Margale, E. and Quiros, C. F. (1991). Isoenzyme nomenclature for eight enzyme systems in three *Brassica* species. In „Proceedings of the Eighth International Rapeseed Congress.“ Saskatoon, July 9-10, 1991.
- Baranyk, P. (2000). Habilitační práce. ČZU Praha.
- Baranyk, P. and Fábry, A. (2007) Řepka: pěstování, využití, ekonomika, 1. Vydání, Praha, Profi press, 208s, ISBN 978 – 808 – 6726 267.

- Barsby T.L. *et al.* (1987): The combination of Polima CMS and cytoplasmatic triasine resistance in *Brassica napus*. *Teor. Appl. Gent.*, 73, s. 809-814.
- Baux, A., Jullien, A., Allirand, J., Ney, B., Hiltbrunner, J., and Pellet, D. (2011). Effects of temperature on oilseed rape fatty acid composition. 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 66.
- Baux, A., Jullien, A., Allirand, J., Ney, B., and Pellet, D. (2011). Effects of nitrogen nutrition on oilseed rape fatty acid composition. 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, p. 67.
- Beschorner, M., Plumper, B. and Odenbach, W. (1995). Analysis of self-incompatibility interactions in 30 resynthesized *Brassica napus* lines. I. Fluorescence microscopic studies. *Theor. Appl. Genet.* 90: 665-670.
- Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., Vrebalov, J., Nasrallah, J. B. (1997). The selfincompatibility (S) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *The Plant Cell* 9: 237-247.
- Brace, J., King, G. J., Ockendon, J. (1994). A molecular approach to the identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant Reprod.* 7, 203-208.
- Browse, J., McCourt, P., and Somerville, C. (1986). A mutant of *Arabidopsis* deficient in C18:3 and C16:3 leaf lipids. *Plant. Physiol.* 81. 859-864.
- Brugière, N., Cui, Y., Rothstein, S. J. (2000). Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Reviews. Elsevier Science*, Vol. 5, No. 10.
- Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M. (1997). „DNA Markers Protocols, Applications, and Overviews.“ Wiley-Liss Inc., New York.
- Cardle, L., Ramsay, L. and Milbourne, D. (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156, 847-854.
- Casselmann, A. L., Vrebalov, J., Conner, J. A., Singal, A., Giovanni, J., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (2000) Determining the physical limits of the *Brassica* S locus by recombinational analysis. *Plant Cell*, 12, 23-33.

- Charters, Y. M., Robertson, A., Wilkinson, M. J. and Ramsay, G. (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5' anchored simple sequence repeats (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 442-447.
- Chen, J. L., and Beversdorf, W. D. (1990). Fatty acid inheritance in microspore-derived populations of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 80,465-469.
- Chevre, A. M., This, P., Eber, F., Deschamps, M., Renard, M., Delseny, M. and Quiros, C. F. (1991). Characterization of disomic addition lines *Brassica napus*-*Brassica nigra* by isozyme, fatty acid, an RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 81, 43-49.
- Curran, P.L. (1962): The nature of our Brassica crops. *Scient. Proceedings* 1, 319 – 335.
- Čurn, V. a Sáková, L. (1997). Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. *Genetika a šlechtění* 33,281-305.
- Čurn, V., Ovesná, J., Sáková, L. and Sobotka, R. (2002). Identification of oilseed rape cultivars using AFLP markers. *Journal of Central European Agriculture* 3, 285-292.
- Čurn, V. and Žaludová, J. (2007) Fingerprinting of oilseed rape cultivars. In: Gupta, S. (ed): *Rapeseed Breeding (Advances in Botanical research, Volume 45)* Elsevier Publ., pp. 155 – 179.
- Čurn, V., Nováková, A., Šimáčková, K. and Kubátová, B. (2008) Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikaci odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.)
- Das, S., Rajagopal, J., Bhatia, S., Srivastava, P. S. and Lakshmikumar, M. (1999). Assessment of genetic variation within *Brassica campestris* cultivars using amplified fragment length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA markers. *Journal of Biosciences* 24, 433-440.
- Delourme, R., Bouchereau, A., Hubert, N., Renard, M. and Landry, B. S. (1994). Identification of RAPD markers linked to fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 88, 741-748.

- Delourme, V., Giranton, J. L., Hatzfeld, Y., Grify, A., Heinzmann, P., Ariza, M. J., Dumas, C., Gaude, T., Cock, J. M. (1995). Characterization of the S locus genes, SLG and SRK, of the *Brassica* S3 haplotype: identification of a membrane- localized protein encoded by the S locus receptor kinase gene. *Plant J* 7: 429-440.
- Delourme, R., Foisset, N., Horvais, R., Barret, P., Champagne, G., Cheung, W. Y., Landry, B. S. and Renard, M. (1998). Characterisation of the radish introgression carrying the Rfo restorer gene for the Ogu- INRA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 97, 129-134.
- Demeke, T., Adams, R. P. and Chibbar, R. (1992). Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): A case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 84, 990-994.
- De Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in angiosperms*. Berlin. Springer.
- Dickinson, H. G. (1995). Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sex. Pl. Reprod.* 8, 1-10.
- Diers, B. W. and Osborn, T. C. (1994). Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 88.662-668.
- Diepenbrock, W., and Wilson, R. F. (1987). Genetic regulation of linolenic acid concentration in rapeseed. *Crop. Sci.* 27, 75-77.
- Diepenbrock, W.; Fischbeck, G.; Heyland, K.U. and Knauer N. (1999): *Spezieller Pflanzenbau*, 3. Aufl., Eugen Ulmar, Stuttgart.
- Dolanská, L. and Čurn, V. (2004). Analysis of SLG gene – The molecular marker in hybrid breeding of oil seed rape. *Journal Central European Argiculture*, Vol 5, No.1, 23-28.
- Dos Santos, J., Skroch, P., Tivang J. and Slocum, M. K. (1994). Comparison of RAPD and RFLP genetics markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotype. *Theoretical and Applied Genetics* 87, 909-915.

- Ekure, U. U., Parkin, I. A. P., Bowman, C., Marshal, D., and Lydiate D. J. (2004) Latent S alleles are widespread in cultivated self compatible *Brassica napus*. *Genome* 42, 257-265.
- FAO (2008).
- Fábry, A. (1992): Olejniny. MZe České republiky, 419, ISBN 80 – 7084-043-9.
- Figdore, S. S., Kennard, W. C., Song, K. M., Slocum, M. K. and Osborn, T. C. (1988). Assessment of degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 75, 833-840.
- Fisher, P. J., Gardner, R. D. and Richardson, T. E. (1996). Single locus microsatellites using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Research* 24, 4369-4371.
- Foisset, N., Delourme, R., Barret, P. and Hubert, N. (1996). Molecular – mapping analysis in *B. napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers.
- Fossati, P., and Fontaine, P. (1994). Endocrine and metabolic consequences of massive obesity. *Rev Prat* 1993; 43: 1935-9.
- Frandsen K.J. (1947). The experimental formation of *Brassica napus* L. var. *oleifera* D.C. and *Brassica carinata* Braun. - *Ibid.* 12: 1 - 16.
- Göring, D. R., Glavin, T. L., Shafer, U., and Rothstein, S. J. (1993). An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1bp deletion. *The Plant Cell*, Vol 5, 531-539.
- Göring, D. R. and Rothstein, S. J. (1992). The S locus receptor kinase in self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* 4: 1273-1281.
- Gowers, S. (1989). Self-incompatibility interaction in *Brassica napus*. *Euphytica* 42, 99-103.
- Grist, S. A.; Firgaira, F. A. and Morley, A. A. (1993): Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. *Bio-Techniques* 15, 304-309.
- Gupta, S. K. and Röbbelen, G. (1986). Identification of rapeseed (*Brassica napus*) cultivars by electrophoresis. *Plant Breeding* 96, 363-370.

- Hájková, P., Hrubý, J., Pernová, E., Čurn, V. and Žaludová, J. (2005). Monitoring pěstebních ploch, přenos a detekce transgenů geneticky modifikované řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *napus*). Sborník vědeckých prací VÚP Troubsko 15, 93-100.
- Halldén, C., Nilsson, N. O., Rading, T. M. and Säll, T. (1994). Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. Theoretical and Applied Genetics 88, 123-128.
- Havel, J. (1996) Production of self- incompatible lines in winter swede rape. Genetika a šlechtění 32, 9-18.
- Hejný, S. a Slavík, B. (1992). Květena České republiky, díl 3., rod Brassica, autor Zelený, V., 205-218, Academia, ČSAV Praha.
- Hinata, K., Watanabe, M., Yamakawa, S., Satta, Y., and Isogai, A.** (1995). Evolutionary aspects of the *S*-related genes of the *Brassica* self-incompatibility system: Synonymous and nonsynonymous base substitutions. Genetics **140**, 1099–1104.
- Hiscock, S. J. and Dickinson, H. G. (1993). Unilateral incompatibility within *Brassicaceae*: Further evidence for involvement of the self – incompatibility (S) locus
- Hiscock, S. J., Doughty, J., Willis, A. C., and Dickinson, H. G. (1995). A 7-kDa pollen borne peptide from *Brassica napus* interacts with S-locus glykoprotein and S-locus related glycoprotein. Planta. 196, 367-374.
- Hong, D., Wan, L., Liu, P., Yang G. and He, Q. (2006). AFLP and SCAR markers linked to the suppressor gene (RF) of a dominant genetic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.), Euphytica 151: 401-409.
- Hraška Š., Bartoš P, and Maršálek L. (1989). Špeciálna genetika poľnohospodárskych rastlín. Príroda, Bratislava
- Hu, J., Quiros, C., Arús, P., Struss, D. and Röbbelen, G. (1995). Mapping of a gene determining linolenic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. Theoretical and Applied Genetics 90, 258-262.



- Hu, J., Li, G., Struss, D. and Quiros C. F. (1999). SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon acids in rapeseed *Brassica napus*. *Plant Breeding* 118, 145-150.
- Hughly, S., Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. (1989) Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and chloroplast ultrastructure in mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant. Physiol.* 90. 1134-1142.
- Chloupek, O. (2000). *Genetická diversita, šlechtění a semenářství*, Academia Praha.
- Chookajorn, T., Kachroo, A., Ripoll, D.R., Clark, A.G., and Nasrallah, J.B. (2004): Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. *PNAS*. 4: 911-917.
- Ilbi, H. (2003). RAPD markers assisted varietal identification and genetics purity test in pepper (*Capsicum annuum*). *Scientia Horticulturae*, vol 97, issue 3-4, 211-218.
- Jain, A., Bhatia, S., Banga, S. S., Prakash, S. and Lakshmikumaran, M. (1994). Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theoretical and Applied Genetics* 8, 116-122.
- Janeja, H. S., Banga, S. S. and Lakshmikumaran, M. (2003). Identification of AFLP markers linked to fertility restorer genes for *tournefortii* cytoplasmic male sterility system in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 148-154.
- Javidfar, F., Ripley, V. L., Roslinsky, V., Zeinali, H. and Abdmishani, C. (2006). Identification of molecular markers associated with oleic and linolenic acid in spring oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Breeding* 125, 65-71.
- Jesske, T., Olberg, B. and Becker H. C. (2011) Resynthesized rapeseed with wild *Brassica* species as new genetic resource for breeding. 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 275.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., and Karp, A. (1997). Reproducibility testing of RAPD,

- AFLP, and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3, 381-390.
- Jourdren, C., Barret, P., Horvais, R., Delourme, R., and Renard, M. (1996). Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica* 90, 351-357.
- Kandasamy, M. K., Paolillo, D. J., Faraday, C. D., Nasrallah, J. B. and Nasrallah, M. E. (1989). The S – locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev. Biol.* 134, 462-472.
- Ke, L., Sun, Y., Liu, P. and Yang, G. (2004). Identification of AFLP fragments linked to one recessive genic male sterility (RGMS) in rapeseed (*Brassica napus* L.) and conversion to SCAR markers for marker-aided selection. *Euphytica* 138, 163-168.
- Ke, L. P., Sun, Y. Q., Hong, D. F., Liu, P. W. and Yang, G. S. (2005). Identification of AFLP markers linked to one recessive genic male sterility gene in oilseed rape, *Brassica napus*. *Plant Breeding* 124, 367-370.
- Kodym, F.S. (1869). Úvod do hospodářství. Hospodářská čítanka. Mikuláš Knapp, Praha-Karlín, 563 s.
- Konieczny, A., and Ausubel, F. M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co – dominant ecotype- specific PCR-based markers. *Plant J.* 4, 403-410.
- Koprna, R., Kučera, V., Kolovrat, O., Vyvadilová, M., and Klíma, M. (2005). Development of initial self-incompatible lines with improved seed quality in winter oilseed rape (*Brassica napus*) for hybrid breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding.* 41, 3: 105-111.
- Koprna, R., Nerušil, P., Kolovrat, O., Kučera, V., and Kohoutek, A. (2006). Estimation of fatty acid content in intact seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L.) lines using NEARS – infrared spectroscopy. *Czech J. Genet. Plant. Breed.*, 42, (4): 132-136.
- Koprna, R. (2007) Využití hybridního systému Ogu/INRA při šlechtění řepky ozimé, PhD thesis, Mendelova Universita.

- Kraic, J. (1994). Identifikácia, vzájomné rozlišovanie odrôd a charakterizácia niektorých vlastností odrôd pomocou detekcie DNA polymorfizmu. *Pol'nohospodárske skúšobníctvo* 2, 15-16.
- Kresovich, S., Williams, J. G. K., McFerson, J. R., Routman, E. J. and Schaal, B. A. (1992). Characterization of genetic identities and relationship of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 190-196.
- Kresovich, S., Szewc-McFadden, A. K., Blied, S. M. and McFerson, J. R. (1995). Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolates from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theoretical and Applied Genetics* 91, 206-211.
- Kučera, V., Vyvadilová M.: Projekt Česká řepka, Úroda 11/2003, ing. Martin Sedláček, str.12.
- Kusaba, M., Nishio, T., Sato, Y., Hinata, K., and Ockendon, D. (1997). Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles of *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implication for evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7673-7678.
- Labana, K.S. and Gupta M.L. (1993). Importance and Origin. - In: Labana K.S., Banga S.S. a Banga S.K. (eds.): *Breeding Oilseed Brassicas*, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, Narosa Publ. House, New Delhi, pp. 1 -7.
- Law, J. R., Domini, P., Koebner, R. M. D., Reces, J. C. and Cooke, R. J. (1998). DNA profilig and plant variety registration. III The statistical assessment of distinctness in beat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102, 335-342.
- Lee, D., Reces, J. C. and Cooke, R. J. (1996). DNA profilig and plant variety registration 2. Restriction fragment length polymorphisms in varieties of oilseed rape. *Plant Varieties and Seeds* 9, 181-190.
- Lemieux, B., Miquel, M., Somerville, C., and Browse, J. (1990). Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acids composition. *Theor. Appl. Genet.* 80, 234-240.

- Lerceteau, E., Robert, T., Petiard, V. and Crouzillat, D. (1997). Evaluation of the extent of genic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 10-19.
- Lombard, V., Baril, C. P., Dubreuil, P., Blouet, F. and Zhang, D. (2000). Genetic relationship and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Science* 40, 1417-1425.
- Lowe, A. J., Moule, C., Trick, M. and Edwards, K. J. (2004). Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1103-1112.
- Lydiate, D., and Sharpe, A. (2003). Aligning genetic map of *Brassica napus* using microsatellite markers. Book of Abstract, Plant and Animal Genome XI, San Diego, USA.
- Mailer, R. J., Scarth, R. and Fristensky, B. (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics* 87, 697-704.
- Marshall, P. J., Marchand, M. C., Lisieczko, Z. and Landry, B. S. (1994). A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F1 hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 853-858.
- McConn, M., and Browse, J. (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development not photosynthesis in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* 8, 403-416.
- Möhring, S, Horstmann, V. and Esch, E. (2005). Development of a molecular CAPS marker for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different S alleles. *Plant Breeding* 124, 105-110.
- Morinaga T. (1934). Interspecific hybridization in Brassica. VI. The cytology of F1-hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. - *Cytologia* 6: 62 - 67.
- Mishima, M., Takayama, S., Sasaki, K., Jee, J., Kojima, C., Isogai, A., and Shirakawa, M. (2003). Structure of the male determinant factor for *Brassica* self incompatibility. *J. Biol. Chem.* 278, 36389-36395.

- Morgante, M. and Olivieri, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3, 175-182.
- Mullis, K. B., Ferre, F. and Gibbs, R. A. (1994). „The Polymerase Chain Reaction.“ Birkhauser, Boston.
- Mundges, H., Köhler, W. and Friedt, W. (1990). Identification of rapeseed cultivars (*Brassica napus*) by starch gel electrophoresis of enzymes. *Euphytica* 45, 179-187.
- Nasrallah, J. B., Kao, T. H., Chen, C. H., Goldberg, M. L., and Nasrallah, M. E. (1987). Aminoacid sequenced of glycoproteins encoded by three alleles of the S-locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 326, 617-619
- Nasrallah, J. B., Nishio, T., Nasrallah, M. E. (1991). The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 393-422.
- Nielsen, G. (1985). The use of isozymes as probes to identity and label plant varieties and cultivars. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medici Research* 12, 1-32.
- Noack J., Paulmann W., Frauen M. (1999): Hybridzüchtung. In: *Berichte aus der Arbeit NPZ/Lembke, 1999, s.11*
- Nou, I. S., Watanabe, M., Isogai, A., and Hinata, K. (1993). Comparison of S- alleles and S-glycoproteins between two wild-type populations of *Brassica campestris* in Turkey and in Japan. *Sex. Plant Reprod.* 6. 79-86.
- Ockendon, D. J. (1975). Dominance relationship between S- alleles in the stigma of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*). *Euphytica* 24, 165-172.
- Ondřej, M. and Drobník, J. (2002). „Transgenose rostlin.“ Academia, Praha.
- Okamoto, S., Sato, Y., Sakamoto, K., and Nishio, T. (2004). Distribution of similar self-incompatibility (S) haplotype in different genera *Raphanus* and *Brassica*. *Sex. Plant. Reprod.* 17, 33-39.

- Okamoto, S., Odashima, M., Fujimoto, R., Sato, Y., Kitashiba, H., and Nishio, T. (2007). Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutation in S- locus genes. *Plant journal* 50, 391-400.
- Ovesná, J., Rulcová, J., Poláková, K., Kučera, L. and Leišová, L. (2002). DNA markery – současnost a perspektiva. In *Sborník přednášek: Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchování genových zdrojů rostlin*. Šumperk: Agritec, a.s., 5-14.
- Paulman, W. (1999). Pokrok ve šlechtění hybridní řepky a pěstování MSL-hybridních odrůd. *Sborník Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin*. 16. - 18. 11. 1999, 96-99.
- Pilinsky, K., Szoke, A., Kiss, E., Heszky, L., and Falusi, J. (2011). Characterization of oilseed genotypes using microsatellite based DNA barcode. 13<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 250.
- Pleines, S., and Friedt, W. (1989). Genetics control of linolenic acid concentration in seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 793-797.
- Pomper, K. W., Azarenko, A. N., Bassil, N., Davis, J. W., and Mehlenbacher, S. A. (1998). Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for self-incompatibility alleles in *Coryllus avellana* L. *Theor. Appl. Genet.*, 479-487.
- Potměšilová, J. and Adamec, J. (2009). Situační a výhledová zpráva Olejnin. Mze ČR.
- Poulsen, G. B., Kahl, G. And Weising, K. (1993). Oligonucleotide fingerprinting of resynthesized *Brassica napus*. *Euphytica* 70, 53-59.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C. H., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2, 225-238.
- Psota, B. (2000). Rostlinné biotechnologie. *Sborník Systém výroby řepky, Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin*, Hluk, 14, 17.11.2000, 77-80.
- Rahman, M. H. (2005). Resynthesis of *Brassica napus* L. for self-incompatibility reaction inheritance and breeding potential. *Plant. Breed.* 124, 13-19.

- Rajcan, I., Kasha, K. J., Kott, L. S. and Beversdorf, W. D. (1999). Detection of molecular markers associated with linolenic and erudic acid levels in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 105, 173-181.
- Reiter, R. S., Williams, J. G. K., Feldmann, K. A., Rafalski, J. A., Tingey, S. D. and Scolnik, P. A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89, 1477-1481.
- Ripley, V. L. and Beversdorf, W. D. (2003). Development of self incompatible *Brassica napus* introgression of S- alleles from *Brassica oleracea* through interspecific hybridization. *Plant Breeding* 122, 1-5.
- Röbbelen, G., and Nitsch, A. (1975). Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acids in rapeseed (*B. napus* L.) I. Selection and description of new mutants. *Z Pflanzenzuechtg* 75, 93-105.
- Röbbelen G. (1985). Raps (*Brassica napus* L.). - In: Hoffmann W., Mudra A. a Plarre W. (eds.): *Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*, B2 - Spez. Teil, Paul Parey, Hamburg, pp. 288-302.
- Roslinsky, V. and Falk, K. (2011). Analysis of fad2B alleles in interspecific derived *Brassica juncea* and *Brassica carinata*. 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 234.
- Saal, B., Plieske, J., Hu, J., Quiros, C. F., and Struss, D. (2001). Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. II Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetics mapping in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet* 102, 695-699.
- Saiki, R. K., Geffand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* 239, 487-491.

- Sakamoto, K., Kusaba. And Nishio, T. (2000). Single – seed PCR-RFLP analysis for the identification of S – haplotypes in commercial F1 hybrid cultivars of broccoli and cabbage. *Plant Cell Rep* 19, 400- 405.
- Sáková, L. and Čurn, V. (1998). Identifikace a klasifikace vybraných odrůd brukvovitých plodin a dihaploidních linií řepky pomocí RAPD markerů. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 34, 61-67.
- Sato, T., Thorness, M. K., Kandasamy, M. K., Nishio, T., Hirai, M., Nasrallah, J. B., and Nasrallah, M. E. (1991). Activity of an S locus gene promoter in pistils and anther of transgenic *Brassica*. *Plant Cell*. 3: 867-876.
- Sato, K., Nishio, T., Kimura, R., Kusaba, M., Suzuki, T., Hatakeyama, K., Ockendon, D. J. and Satta, Y.(2002): Coevolution of the S-locus genes SRK, SLG and SP11/SCR in *Brassica oleracea* and *B. rapa*. *Genetics* 162: 931-940.
- Scarth, R., Mc Vetty, P. B. E., and Stefansson, B. R. (1988). Stellar low linolenic-high linoleic acid summer rape. *Can J Plant Sci* 68, 509-511.
- Schenck H.R. a Wolf G. (1986): Characterization of somatic *Brassica napus* hybrids by polyacrylamide gel electrophoresis. - *Plant Breed.* 97: 72 - 74.
- Scott, M., Haymes, M. and Williams, S. M. (1992). Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research* 20, 5493.
- Sebastian, R. L., Howell, E. C., King, G. J., Marshall, D. F., and Kearsey, M. J. (2000). An integrated AFLP and RFLP *Brassica oleracea* linkage map from two morphologically distinct doublehaploid populations. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 75-81.
- Seyis, F., Snowdon, R. J., Lush, W., and Friedt, W. (2003). Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breeding* 122, 473-478.



- Sharma, R., Aggarwall, R. A. K., Kumar, R., Mohapatra, T., and Sharma, R. P. (2002). Construction of an RAPD linkage map and localization of QTL for oleic acid level using recombinant inbreds in mustard (*Brassica juncea*). *Genome*, 45, 467-472.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, T., Shimosato, H., Che, F. S., Satta, Y., Ito, A., Takada, Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2002). The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *Plant Cell* 14, 491-504.
- Schierhold, A., Beder, H. C. and Ecke, W. (2000). Mapping a high oleic acid station in winter oilseedrape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101, 897-901.
- Scheffler, J. A., Sharpe, A. G., Schmidt, H., Sperling, P., Parkin, I. A. P., Lühs, Lydiate, D. J., and Heinz, E. (1997). Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. *Theor. Appl. Genet.*, 94, 583-591.
- Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*. 286, 1697-1700.
- Snowdon, R. J., Friedt, W. (2004). Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding current status and future possibilities. *Plant Breeding* 123, 1-8.
- Sobotka, R. SÁKOVÁ, L. and ČURN, V. (2000). Molecular mechanisms of self-incompatibility in *Brassica*. *Curr. Issues Mol. Biol.*, Caister Acad. Press, 2: 103-112.
- Sobotka, R., Dolanská, L., ČURN, V. and Ovesná, J. (2004). Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *Journal of Applied Genetics* 45, 161-173.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. and Doyle, J. J. (1998). „Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing.“ Kluwer Academic Publishers, Novell, MA.
- Somers, D. J., Friesen, K. R. D. and Rakow, G. (1998). Identification of molecular markers associated with linolenic acid desaturation in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 897-903.
- Song, K. and Osborn, T. C. (1992). Polyphyletic origins of *Brassica napus*. New evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome* 35, p. 992-1001.

- Spasibionek, S., Mikolajczyk, K., Pietka, T., Poplawska, W. and Bartkowiak-Broda, I. (2011). Breeding of oilseed rape for new seed oil quality, Abstract book, 13th International Rapeseed Congress, Prague, p. 53.
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E. and Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of stative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. Proc. Natl. Acad. SCI. USA. 88: 8816-8820.
- Sundberg, E. and Glimelius, K. (1986a). A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatics hybridisation, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. Plant Science 43, 155-162.
- Sundberg, E. and Glimelius, K. (1986b). Production of hybrid plants within *Brassicaceae* by fusing protoplasts and plasmolytically induced cytoplasts. Plant Science 79, 205-216.
- Schwanitz F. (1967). Die Evolution der Kulturpflanzen, BVL München- Basel-Wien, překlad V. Osvačilová, SZN Praha 1969
- Szewc-McFadden, A. K., Kresovich, S., Bliet, S. M., Mitchell, S. E. and McFerson, J. R. (1996). Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeat (SSRs) in cultivated *Brassica* species. Theoretical and Applied Genetics 93, 534-538.
- Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., and Hinata, K. (1999). Genomic organization of the S-locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). Genetics. 153, 391-400.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (2000). The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. Nature 403, 913-916.
- Tanhuanpää, P. K., Vilkki, J. P. and Vilkki, H. J. (1995). Association of an RAPD marker with linolenic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). Genome 38, 414-416.

- Tanhuanpää, P. K., and Schulman, A. (2002). Mapping of genes affecting linolenic acid content in *B. rapa* ssp. *oleifera*. *Molecular Breeding*, 10, 51-62.
- Thormann, C. E., Ferreira, M. E., Camargo, L. E. A., Tivang, J. G. and Osborn, T. C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 973-980.
- Tommasini, L., Batley, J., Arnold, G. M., Cooke, R. J., Donini, P., Lee, D., Law, J.R., Lowe, C., Moule, C., Trick, M., and Edwards, K. J. (2003). The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1091-1101.
- Tu J., Fu T., Zhang Y., Tian S. (1999). Studies on the recessive genic male sterility and its genetic markers in rapeseed (*Brassica napus* L.). Proceedings of the Tenth International Rapeseed Congress, september 26-29, 1999, Canberra, Australia.
- U, N. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. - *Jap. J. Bot.* 7: 389 - 452.
- UPOV (2002). General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties, Geneva.
- Uzunova, M. I., Ecke, W., Weissleder, K. and Röbbelen, G. (1995). Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.) I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 194-204.
- Uzunova, M. I. and Ecke, W. (1999). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*B. napus* L.). *Plant Breeding* 118, 323-326.
- Vašák, J., Fábry, A., Zukalová, H., Morbacher, J., and Baranyk, P. (1997). Systém výroby řepky, Česká a slovenská pěstitelská technologie ozimé řepky pro rok 1997- 1999, SPZO Praha.

- Vos, P., Hoegrs, R., Bleeker, M., Rijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Vos, P. and Kuiper, M. (1997). AFLP analysis. In „DNA Markers Protocols, Applications and Overviews“ (G. Caetano-Anolles and P. M. Gresshoff, eds.), pp. 115-132. Eley-Liss Inc., New York.
- Warwick, S. I., Simard, M. J., Legere, A., Beckie, H. J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Seguin-Swartz, G. and Stewart, C. N. (2003). Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Wild) OE Schulz. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 528-539.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. (1995). „DNA Fingerprinting in Plants and Fungi.“ CRC Press, Boca Raton, FL.
- Weising, K., Winter, P., Hüttel, B. and Kahl, G. (1998). Microsatellites markers for molecular breeding. *Journal of Crop Production* 1, 113-143.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G. (2005). „DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications.“ CRC Press, Boca Raton, FL.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- Winkelmann, H. E., Baer, A., Frauen, M. (1998). Možnosti zvyšování výnosů řepky v České republice. *Sborník Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin*, 17. 17.11.1998.
- Xu, Z., Xie, Y., Hong, D., Liu, P. and Yang, G. (2009). Fine mapping of the epistatic suppressor gene (ESP) of a recessive genic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Genome* 52 (9), 755-760.
- Yu, Ch., Leišová, I., Kučera, V., Vyvadilová, M., Ovesná, J., Dotlačil, L., and Hu, S. (2007). Assesment of genetic diversity of yellow seeded rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by AFLP markers. *Czech J. Genet. Plant. Breed.*, 43, (3), 105-112.

- Zhi-Wen, L., Ting-Dong, F., Jing-Xing, T. and Bao-Yuan, C. (2005). Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 110, 303-310.
- Zhang, X., Ma, Ch., Tang, J., Tang, W., Tu, J., and Fu, T. (2008). Distribution of S haplotypes and its relationship with restorer-maintainers of self-incompatibility in cultivated *Brassica napus*, *Theor. Appl. Genet* 117: 171-179.
- Zhao, J., Ding, Y., Xu, F., Liu, Y., Huang, J., Chen, F., and Ni, X. (2011). Fine mapping of an oil content quantitative trait locus in the linkage group 7 of *Brassica napus*. *Genomics and Biotechnology I.*, 13th International Rapeseed congress, Prague, p. 123.
- Žaludová, J. (2007). The structure and the fiction of the S- locus in oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Disertační práce*, JU ZF České Budějovice.