

J I H O Č E S K Á U N I V E R Z I T A
V Č E S K Ý C H B U D Ě J O V I C Í C H
Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a

Diplomová práce

V ý v o j m o l e k u l á r n í c h s e l e k č n í c h m a r k e r ů
v p r o g r a m e c h š l e c h t ě n í h y b r i d n í c h o d r ů d
ř e p k y

Autor: Bc. Ondřej Hejna

Vedoucí magisterské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant magisterské práce: Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.

2013

Hejna, O. 2013. Vývoj molekulárních selekčních markerů v programech šlechtění hybridních odrůd řepky [Development of selectable molecular markers in oil seed rape breeding, Master Thesis, in Czech] Faculty of Agriculture, The University of South Bohemia.

Abstrakt

Tato práce se zabývá detekcí autoinkompatibilních rostlin řepky olejné (*Brassica napus* L.) pomocí molekulárních technik. V průběhu experimentu byla optimalizovaná technika izolace DNA pro testovaný soubor rostlin. Na základě testování specifity vybraných primerů na autoinkompatibilních (AI) a autokompatibilních (AK) rostlinách byly vybrány primery pro PCR analýzu. Výsledkem práce byla optimalizovaná multiplexová PCR reakce, pomocí které byly rozlišeny AI a AK rostliny.

Annotation

This thesis deals with the detection self-incompatibility oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using of molecular techniques. During the experiment was optimized DNA isolation technique for a test set of plants. Specific primers for self-incompatible (SI) and self-compatible (SC) plants detection were selected for PCR analysis. A result of this work was optimized multiplex PCR reaction for detection of SI and SC plants.

Prohlašuji, že svoji diplomovou disertační práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 26. 4. 2013

Ondřej Hejna

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především Ing. Lence Havlíčkové, Ph.D. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za vedení, pomoc a cenné rady při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěl také poděkovat Ing. Evě Jozové za pomoc při práci v laboratoři a v neposlední řadě také mé přítelkyni Monice Leitgebové za jazykovou korekturu.

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1 Využití řepky	8
1.1.1 Využití řepky u nás.....	8
1.2 Vznik druhu	9
1.3 Šlechtění řepky	9
1.3.1 Historie šlechtitelství u nás.....	10
1.3.2 Využívané hybridní systémy	12
2. Techniky řízeného opylení.....	13
2.1 Cytoplazmatická samčí sterilita	13
2.1.1 Významné CMS systémy u řepky olejné	14
2.2 Jaderná samčí sterilita.....	15
2.3 Autoinkompatibilita.....	15
2.3.1 <i>SLG</i> gen	17
2.3.2 <i>SRK</i> gen	18
2.3.3 <i>SCR</i> gen	19
2.3.4 Další S-lokus geny.....	20
2.3.4.1 <i>SLA</i> gen.....	20
2.3.4.2 Geny <i>SLL1</i> a <i>SLL2</i>	20
2.3.5 Autoinkompatibilní reakce	21
2.4 Molekulární DNA markery.....	22
2.5 Technologie MAS.....	23
2.6 Polymerázová řetězová reakce.....	24
2.6.1 Multiplexová PCR.....	25
2.7 Gelová elektroforéza.....	25
2.8 Sekvenování DNA	26
3. Materiál a metody	27
3.1 Materiál.....	27
3.2 Izolace DNA	28
3.2.1 Extrakční metody s pomocí komerčních kitů.....	28
3.2.1.1 Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN)	28

3.2.1.2 Izolace DNA pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu (INVITEK)	29
3.2.2 Standardní izolační metody	29
3.2.2.1 Izolace DNA pomocí CTAB	29
3.2.2.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon).....	29
3.3 Postupy použitých izolačních metod	30
3.3.1 Tissue.....	30
3.3.2 CTAB	30
3.4 Analýzy DNA markerů.....	31
3.4.1 Analýza <i>SLG I</i>	31
3.4.2 Analýza <i>SLG II</i>	32
3.4.3 PCR-RFLP analýza genů <i>SLG</i>	32
3.4.4 Analýza <i>SCR II</i>	32
3.5 Měření koncentrace DNA.....	33
3.6 Postup PCR reakce	33
3.7 Elektroforetická separace.....	34
4. Výsledky	35
4.1 Izolace DNA	35
4.2 Testování vhodných primerů	36
4.3 Molekulární selekce AK rostlin.....	38
5. Diskuze	40
5.1 Porovnání jednotlivých metod izolace DNA	40
5.2 Výběr vhodných primerů	41
5.2.1 Primerový pár PS5/PS15	41
5.2.2 Primerový pár e/f.....	41
5.2.3 Primerový pár PK1/PK4.....	42
5.2.4 Primerový pár BnSLG+BrS47/BnSLG-Ws-1	42
5.2.5 Primerový pár SLGa F/SLGa R	42
5.3 Molekulární selekce	43
6. Závěr.....	44
7. Seznam použité literatury.....	45
8. Příloha	52

1. Úvod

Brukev řepka olejná (*Brassica napus* var. *napus*) hospodářsky významný zástupce rodu brukev (*Brassica*) spadá do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jedná se o jednoletou nebo dvouletou statnou bylinu dorůstající od 60 do 120 cm výšky. Přímá tmavě zelená až modrozelená lodyha nese přisedlé kopinaté listy bez trichomů. Naopak spodní listová růžice je složena z řapíkatých listů s trichomy. Jako dvouděložná rostlina vytváří jeden hlavní kořen, který je mohutný a kuželovitý. Řepka kvete výrazně žlutou barvou po dobu 20 – 25 dní. V našich podmínkách se tak obvykle děje v květnu. Jednotlivé květy stavěny podle čísla 4 jsou uspořádány do hroznovitého květenství. Řepka je převážně samosprašná, nicméně podíl cizosprašení bývá relativně vysoký. Obvykle 30 – 40 % květů je opyleno jinou rostlinou. Podíl takto opylených květů záleží hlavně na aktivitě včel, dále se také uplatňují vlivy jako počasí v době květu a genetické dispozice jednotlivých odrůd. Řepka je rostlina včelomilná, včely se na opylování podílí více jak z 90 %, zbylý podíl připadá hlavně větru. Po odkvětu se vytváří plod tvaru dvouřadé šešule obsahující přibližně 20 drobných kulovitých semen. Jejich hmotnost se pohybuje v řádech miligramů. Barevnost semen může být u jednotlivých odrůd odlišná. Semena mají zpravidla lesklou fialovohnědou až černou barvu (Hrouda et al 2002, Hejný & Slavík 2003).

Cílem diplomové práce bylo posoudit genetické odlišnosti z dostupných souborů genetický zdrojů *Brassica napus* nesoucí znaky autoinkompatibility. Na základě zjištěných rozdílů mezi autoinkompatibilními (AI) a autokompatibilními (AK) rostlinami budou vybrány případně i navrženy specifické primery pro PCR analýzu a detekci rostlin s požadovanými znaky autoimkompatibility.

Autoinkompatibilní rostliny řepky se přirozeně vyskytují jen vzácně, jelikož tento znak je přenášen recesivně. Praktické použití identifikace těchto znaků je velice důležité. AI rostliny jsou totiž velkou výhodou při hybridním šlechtění. Pomocí specifických primerů lze takové rostliny snadno a rychle selektovat už v raných fázích vývoje.

1.1 Využití řepky

Historie pěstování této olejniny spadá už do období středověku, kdy lidé začali využívat řepkový olej lisovaný ze semen na svícení. V současné době je řepka využívána v daleko větším rozsahu než kdy dříve. Své uplatnění našla v potravinářském a chemickém průmyslu. Jako potravinářská surovina je využívána pro zvířata (extrahované šroty, zelené krmění, pokrutiny a součást krmných směsí) i lidi (řepkový olej). Pro chemický průmysl se stala zdrojem pro výrobu bionafty, ekoolejů a ekomazadel. Slouží tedy jako významný zdroj obnovitelné energie (Baranyk & Fábry 2007).

Celkově je řepka olejná dnes třetím největším zdrojem rostlinného oleje na světě. Ročně je spotřebováno 12,1 miliónů tun řepkového oleje. Přibližně 1/5 je určena přímo pro potravinářský průmysl, 3/5 jsou určeny pro výrobu bionafty a 1/5 je přímo použita jako ekologický motorový olej pro těžkou techniku. Současným zvyšujícím se trendem je využití oleje pro nepotravinářské účely.

V neposlední řadě je řepka také využívána v zemědělství. Slouží jako vynikající předplodina pro obiloviny, zvyšuje též úrodnost a odpleveluje. Často je také použita jako zelené hnojivo (Baranyk & Fábry 2007).

1.1.1 Využití řepky u nás

V současné době je řepka u nás spolu s obilovinami jednou z hlavních tržních plodin. Pěstována je ve dvou formách – jarní a ozimá. V nichž větší podíl připadá na ozimou řepku. Ta je u nás vysévána na více než 90 % osevních ploch pro řepku.

V našich podmínkách je vegetační doba ozimé řepky kolem 320 dní a musí projít jarovizací (Zehnálek 2012).

1.2 Vznik druhu

Řepka olejná vznikla jako spontánní hybrid dvou druhů *Brassica rapa*, $2n = 20$; a *Brassica oleracea*, $2n = 18$. Předpokládá se, že druh *Brassica napus* vznikl relativně nedávno na místech, kde byly předchozí druhy pěstovány v blízkosti. Ve volné přírodě nebyl tento druh nikde pozorován. *Brassica napus* se skládá ze dvou oddělených poddruhů, prvním je brukev řepka tuřín *Brassica napus* ssp. *napobrassica* a druhým brukev řepka olejná *Brassica napus* ssp. *napus*. Druhý jmenovaný zahrnuje odrůdy vysazované na jaře a v zimě (Snowdon & Friedt 2007).

1.3 Šlechtění řepky

Řepka olejná získala na významu až relativně nedávno. Dříve plodina nevelkého významu se za poslední tři desetiletí stala jednou z nejvíce pěstovaných olejnin napříč celým mírným pásem. Za razantním nástupem pěstování této plodiny stojí nebývalé úspěchy v jejím šlechtění.

Rostliny řepky obsahují v semenech přirozeně velké množství kyseliny erukové. Tato látka je velmi hořká a může ve větších dávkách způsobit poruchy kardiovaskulárního systému. Dříve byl proto řepkový olej používán jen pro nepotravinářské účely. Až v 70. letech se šlechtěním dosáhlo výrazného snížení obsahu kyseliny erukové v řepkovém oleji. Výsledná odrůda německé jarní řepky „Liho“ označovaná jako typ 0 obsahovala méně než 1 % obsahu kyseliny erukové (Downey 1990). Dřívější odrůdy obsahovaly i více než 50 % kyseliny erukové v řepkovém oleji. Tento nebývalý šlechtitelský úspěch znamenal počátek použití řepkového oleje pro potravinářské účely (Snowdon & Friedt 2007).

Dalším šlechtitelským úspěchem bylo vyšlechtění odrůd s nízkým obsahem glukosinolátů. V přirozených odrůdách řepky olejné se vyskytuje relativně velké množství sirných sekundárních metabolitů – glukosinolátů. Jejich nebezpečí spočívá

při trávení, kdy jsou přeměňovány na toxické látky způsobující poškození jater a ledvin. V roce 1969 byla uvolněna varianta polské jarní řepky „Bronowski“ s nízkým obsahem glukosinolátů, která se stala cílem pro další šlechtění. V roce 1974 tyto snahy vyústily v představení odrůdy „Tower“ kombinující nízký obsah kyseliny erukové a glukosinolátů. Takovéto odrůdy jsou označovány jako typ 00. Počínaje tímto historickým bodem nastal velký rozmach v pěstování řepky olejné po celém mírném pásu (Snowdon & Friedt 2007).

Po uvolnění odrůd typu 00 se šlechtitelské snahy zaměřily na obsah kyselin linolové a olejové. Výsledkem bylo zaregistrování dvou nových odrůd „Splendor“ a „Nexera“ se 75 % obsahem kyseliny olejové a méně než 3 % obsahem kyseliny linolenové. Snížením podílu kyseliny linolenové a zvýšením obsahu kyseliny olejové získal řepkový olej nebyvalou oxidační stálost. Zároveň se také olej stal vhodným pro smažení, při kterém dříve vznikaly nebezpečné transmastné kyseliny (Snowdon & Friedt 2007).

Po objevení systémů řízeného opylení (jaderné samčí sterility GMS, cytoplazmatické samčí sterility CMS a autoinkompatibility AI) se hlavní záměry šlechtitelů přesunuly na vytváření hybridních odrůd. Takovéto šlechtění u řepky se využívá z mnoha důvodů. Výhodou je především heterozní efekt, vysoký množitelský koeficient a existence geneticky podmíněných autosterilních systémů. Naopak nevýhodou je nutnost použití jaderné samčí sterility, transgenní pylové sterility nebo cytoplazmatické samčí sterility pro zisk a produkci čistého hybridního osiva.

V současné době se šlechtitelská činnost stále více opírá o nové techniky molekulární biologie, které výrazně urychlují šlechtitelské postupy. Nejdříve se započalo s mapováním RFLP markerů a následnou tvorbou genetických map. Nyní se největší snaha upírá k identifikaci ekonomicky významných znaků řepky a tvorbě jejich markerů. Takovéto selekční markery otevírají cestu k jednoduché a levné identifikaci požadovaných znaků pomocí PCR.

1.3.1 Historie šlechtění řepky nás

Šlechtění řepky olejné má na území České republiky tradici sahající do 40. let 20. století. Přestože v té době neměla tato plodina velký význam, šlechtitelské stanice

u nás vyšlechtily několik odrůd řepky ozimé – odrůda Třebíčská krajová 1941, Slapská 1946 nebo odrůda jarní řepky Česká krajová 1949. Do doby než tyto odrůdy byly k dispozici, pěstovaly se pouze krajové domácí a zahraniční odrůdy. V 60. a 70. letech byly hlavní snahy šlechtitelů směřovány k zlepšení odolnosti vůči chladu, nepukavosti šesulí a ke snížení obsahu kyseliny erukové. V tomto období byla registrována odrůda Mira. V 80. a 90. letech byl zahájen výzkum heteroze a autoinkompatibility a dále se pozornost soustředila na nově uvolněné zahraniční odrůdy s nízkým obsahem kyseliny erukové, glukosinolátů (0 typ, 00 typ, E0 typ). Velmi nízké koncentrace kyseliny erukové a glukosinolátů značně rozšířily použití řepky u nás a následně se významně rozšířily osevní plochy. Od této doby řepka získává daleko větší pozornost a je registrována řada nových odrůd. Odrůda Silesia 1983 (typ 0), Solida 1986 (typ 0), Sonáta 1990 (typ 00), Aglona 1993 (typ 00), Slapská Stela 1996 (typ 00) a Odila 1997 (Baranyk & Fábry 2007).

Novodobá historie šlechtění řepky u nás je charakterizována vznikem organizace nazývané Česká řepka spojující výzkumnou činnost s praktickým šlechtěním. Iniciací vzniku tohoto sdružení byla neschopnost malých českých šlechtitelských firem konkurovat velkým silným společnostem v zahraničí. Vyšlechtění nových odrůd nese v současné době nemalé finanční náklady a časovou náročnost. Proto vznik tohoto sdružení byl vítaným impulzem podpory šlechtění řepky u nás. Do dnešní doby toto sdružení zaznamenalo několik úspěchů v podobně registrace nových odrůd kvalitou srovnatelných se zahraničím – Oponent 2006, Aplaus 2007, Opus 2007, Oksana 2007 a Benefit 2009. Nemalý podíl na těchto úspěších má i spolupráce tohoto sdružení s Výzkumným ústavem rostlinné výroby na Praze – Ruzyni a s Biotechnologickým centrem Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (Zehnálek 2012).

V budoucnosti by se šlechtitelská činnost České řepky měla ubírat několika různými směry. V první řadě jsou cíle zaměřené na tvorbu nových variant s žádanými vlastnostmi složení oleje, výnosu a kvality včetně produkce dihaploidů. V hybridním šlechtění je vytyčeno zaměření na cytoplazmatickou samčí sterilitu typu *Ogu-INRA* a typu *Shaan 2A* a dále na sporofytickou autoinkompatibilitu. V neposlední řadě by se také Česká řepka měla zabývat šlechtěním vůči stresovým faktorům, škůdcům a chorobám.

1.3.2 Využívané hybridní systémy

- **Systém MSL neboli samčí sterilita Lembke**

Podstatou je spontánní mutace a selekce ve šlechtitelských školkách. Systém je využíván u velkého množství hybridních odrůd řepky s dobrou restaurací a nízkou hladinou glukosinolátů (Baranyk & Fábry 2007).

- **Systém LibertyLink®**

Základním principem tohoto systému je odolnost k Liberty herbicidu (glufosinate-NH₄). Poskytuje rovnoměrné dozrávání. Těžištěm jeho použití je severní Amerika (USA a Kanada), (Baranyk & Fábry 2007).

- **Systém SeedLink**

Podstatou tohoto systému je využití F1 generace s geneticky řízenou samčí sterilitou k produkci hybridního osiva. Rostliny obsahují geny pro inhibici tvorby prašníků a odolnost k Liberty herbicidu. Výhodou tohoto systému je tvorba vysoce kvalitního a výkonného osiva a možnost použití Liberty herbicidu pro odstranění plevelů (Baranyk & Fábry 2007).

- **Systém INRA/Ogura nebo též OGU-INRA**

Tento systém využívá aloplozmatickou samčí sterilitu. Tento mechanismus byl vytvořen přenosem genu obnovy fertility *Rf* z rodu *Raphanus*. Nevýhodou tohoto systému je použití jen u odrůd s vyšším množstvím glukosinolátů a snížená samčí fertilita obnovitelů (Baranyk & Fábry 2007).

2. Techniky řízeného opylení

2.1 Cytoplazmatická samčí sterilita

Cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) je běžným jevem u planě rostoucích rostlin. Její příčinou jsou různé poruchy procesu mikrosporogeneze nebo mikrogametogeneze. Takovéto rostliny následně nevytváří pyl nebo tvoří pyl nefunkční. Fenotypově se tyto rostliny projevují deformací nebo úplnou absencí prašníků. Některé CMS systémy se dnes široce využívají u komerčních plodin jako obrana proti samoopylení při tvorbě hybridního osiva. V současné době je věnována velká pozornost pochopení stávajících CMS systémů na biochemické, molekulární a genetické úrovni. Nemalá snaha je též směřována na odhalení, případně vytvoření nových CMS systémů (Chase 2006).

Cytoplazmatická samčí sterilita je děděna vždy maternálně, jelikož závisí pouze na faktorech v cytoplazmě. Určujícím faktorem jsou geny řídící samčí plodnost v mitochondriální DNA. Při mutaci těchto genů rostliny ztrácejí schopnost tvořit pyl nebo tvoří pyl nefunkční. Kromě samčí sterility může změna těchto mitochondriálních genů vést i k významným fenotypovým změnám. Funkce mutovaných mitochondriálních genů pro samčí fertilitu může být nahrazena jadernými geny stejného působení. Takovéto geny se nazývají obnovitelé fertility a jsou přítomny v jádře jako alelové páry. Alela neschopná obnovit fertilitu je obvykle recesivního typu a označuje se jako *rf* nebo *ms*. Naopak dominantní alela *Rf* nebo *Ms* obnovuje samčí plodnost. Takovýchto systémů kombinujících nefunkční mitochondriální geny pro samčí fertilitu a jaderné geny obnovující plodnost je celá řada (Chase 2006).

Praktické použití CMS nese kromě výhod také některé podstatné nevýhody. Po celou dobu je nutné držet v kultivaci vhodné obnovitele fertility. Tyto obnovitelé však často podléhají různým způsobem fenotypovým aberacím. Dále také sterilní cytoplazma může ovlivňovat kvalitu a množství sklizně. V neposlední řadě některé CMS systémy nejsou plně funkční a mohou být ovlivňovány teplotou i dalšími vlivy prostředí (Tu et al 1999).

Některé nevýhody by v budoucnu mohly být eliminovány vnášením genů obnovujících fertilitu. Hlavním cílem by proto měla být izolace již známých genů obnovitelů fertility, které by pak mohly být různými způsoby rostlinné transformace vnášeny do sterilních rostlin. Tímto způsobem by odpadlo v některých případech obtížné udržení obnovitelů fertility.

2.1.1 Významné CMS systémy u řepky olejné

○ *Nap* CMS systém

CMS *nap* byl prvním objeveným CMS systémem. K jeho popsání došlo v roce 1972 autory Thompsonem a Shigou. Tento systém vznikl zkřížením ozimé řepky a odrůdy „Bronowski“. Jako obnovitel fertility je zde gen *Rfn*, který je ale bohužel velice častý. Proto jen velice málo genotypů může být sterilizováno pomocí tohoto systému. Další nevýhodou *nap* CMS je silná závislost pylové sterility na počasí. Při vyšších teplotách se plodnost obnovuje. Díky těmto nevýhodám se tento systém stal pouze historickým milníkem, ale nikdy nebyl použit pro komerční produkci hybridního osiva (Li et al 1998).

○ *Pol* CMS systém

Pol CMS systém též nazývaný Polima vznikl spontánně uvnitř druhu *B. napus*. Tento CMS systém je daleko více teplotně stabilní než *nap* CMS. Zároveň obnovitel fertility *Rfp* není tak častý, proto je možnost tento systém použít u mnoha odrůd řepky olejné. Hlavní využití tohoto systému je v Číně, kde přibližně 70 % odrůd řepky založené na CMS využívá *pol* CMS. Naopak v Evropě se tento systém téměř nevyužívá (Zhao et al. 2010).

- **Ogu CMS systém**

Třetí významná forma CMS nazývaná *ogu* nebo Ogura je založena na použití cytoplazmy z ředkve. Ogura (1968) přenesl mezidruhovým křížením jádro *B. oleracea* do cytoplazmy *Raphanus sativum* obsahující faktory samčí sterility. Jako obnovitel fertility byl identifikován gen *Rfo*. Studie ukázaly, že působení genu *Rfo* je na translační úrovni (Grelon et al 1994). Linie obnovitelů fertility u *ogu* CMS byla vytvořena vnesením *Rfo* genu z ředkve *R. sativum* do *B. napus*. Problém této formy CMS je udržení obnovitelů a zvýšený obsah glukosilolátů vnesením genu *Rfo*.

2.2 Jaderná samčí sterilita

Jaderná samčí sterilita (GMS) je jedním ze způsobů řízeného opylení. Jedná se o plnohodnotnou alternativu k CMS i autoinkompatibilitě a používá se též k zabránění samosprášení a vytváření čistého hybridního osiva u řepky olejné. Hlavní výhody GMS proti CMS jsou stabilní a úplná samčí sterilita, nepřítomnost negativních jevů spojených s faktory samčí sterility v CMS cytoplazmě a relativní snadnost přenosu genů zodpovědných za samčí sterilitu do jiných odrůd (Lu et al 2004).

GMS je determinována recesivní alelou *ms* nebo dominantní alelou *Ms* sporofytického typu. Supresorové geny obnovující samčí sterilitu se označují jako *rf* resp. *Rf*. Doposud bylo objeveno mnoho GMS systémů řízených jedním genem (Hu et al 2000), dvěma geny (Li et al 1985) a případně i třemi geny (Wang et al 2001). Li et al (1995) navrhl a v praxi odzkoušel GMS systém pro získání čistého hybridního osiva *B. napus*.

2.3 Autoinkompatibilita

Autoinkompatibilita (AI) je pojem vyskytující se napříč celou rostlinou říší a charakterizuje neschopnost rostliny dosáhnout opylení vlastním pylem neboli samosprášení. Autoinkompatibilní rostlina má schopnost rozpoznat pyl z vlastních

prašníků a zabránit takovému pylu v opylení. Tuto přirozeně se vyskytující schopnost můžeme vzácně nalézt i u některých odrůd řepky olejné, přirozeně je však řepka olejná kompatibilní neboli samosprašná (Gowers 1989). Ve velké míře se AI vyskytuje u volně rostoucích druhů brukvovitých (*Brassicaceae*). Dokonce i oba druhy *Brassica oleracea* a *Brassica rapa*, jejichž křížením *Brassica napus* vznikla, jsou přirozeně AI (Downey & Rakow 1987). Podstata AI u celé čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) je rozpoznání povrchu pylových zrn svrchními buňkami blizny. Takovýto typ AI se označuje jako sporofytický, podle rozpoznávané povrchové vrstvy pylového zrna, která je produktem sporofytických buněk tapetální vrstvy prašníku. Dále je sporofytický typ AI rozšířen i u čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*), (Hiscock et al 1993). Klíčovou roli při AI reakci hrají povrchové buňky blizny a tapetální vrstva buněk vytvářející povrchovou vrstvu pylu (Sobotka et al 2000).

Autoinkompatibilita je při produkci hybridů velice žádaným znakem. Křížením dvou AI parentálních linií je v ideálním případě výsledkem čistá F1 linie hybridů. Proto je třeba při výběru AI parentálních linií vybírat opravdu rostliny se silnou AI reakcí. Takový výběr se provádí molekulární analýzou s vhodnými selekčními markery.

Genetická podstata AI reakce byla lokalizována už v 70. letech na úsek DNA označovaný jako S-lokus. Velké počty alel tohoto lokusu jsou označovány jako S-alely. Jejich počet je u druhu *B. rapa* odhadován na 30 (Nou et al 1993) a u druhu *B. oleracea* dokonce na více než 50 (Brace et al 1994) Jednotlivé alely se dělí zpravidla do dvou skupin podle síly AI reakce. První typ je charakteristický silnější AI reakcí a dominancí nad druhým slabším typem. Průměrný počet semen v šešuli se u prvního typu pohybuje od 0 do 10 semen a u druhého od 10 do 30 semen (Nasrallah et al 1991). Do současné doby bylo na S-lokusu *B. napus* lokalizováno přes dvě desítky genů a počet pravděpodobně ještě není konečný. Z hlediska AI reakce se zdají být klíčové tři geny – *SLG*, *SRK* a *SCR*. Celý S-haplotyp je vysoce polymorní podobně jako geny podílející se na vyvolání imunitní reakce u živočichů. Nepolymorní jsou jen části genů sloužící k rozpoznávání (Sobotka et al 2000).

2.3.1 *SLG* gen

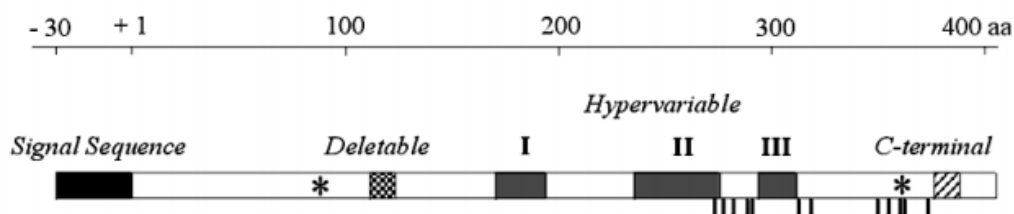
SLG gen (S-locus glycoprotein, identifikován Nasrallah et al 1985) byl prvním nalezeným genem S-lokusu. Tento gen je vysoce polymorfní. Hlavním místem jeho exprese jsou povrchové buňky zralé blizny. Dále byla jeho nízká transkripce prokázána i v prašnicích nikoli však příslušný protein. V ostatních částech rostlin nebyla exprese *SLG* genu nikdy detekována (Delorme et al 1995).

Prokázalo se, že se protein tohoto genu podílí částečně na identifikaci vlastního pylu na povrchu zralé blizny. Přesná úloha tohoto genu při AI reakci však není dosud přesvědčivě identifikována. Mutací *SLG* genu obvykle dochází k poruše AI reakce rostliny (Nasrallah et al 1994). Bylo totiž prokázáno, že v AI rostlinách je exprese *SLG* genu relativně malá s porovnáním některých kompatibilních haplotypů. Je proto přijímán fakt nutné interakce s dalšími geny S-lokusu především *SRK* genem (Gaude et al 1995). Proteinový produkt *SLG* genu povětšinou zvyšuje sílu AI reakce (Schopfer et al 1999).

Fyzicky je gen *SLG* charakterizován délkou přibližně 1300 bází (obr. 1) a kóduje specifický glykoprotein o velikosti přibližně 55 kDa. K sekreci tohoto proteinu dochází v povrchové papilární vrstvě zralé blizny. Přestože je *SLG* vysoce polymorfní, není tomu tak po celé jeho délce. Bylo prokázáno, že v jeho struktuře se vyskytují konzervativní sekvence 12 cysteinových reziduí, klíčové pro správnou funkci a strukturu proteinu. Dále bylo také identifikováno několik N-glykosilačních míst, z nichž dvě mají konzervativní sekvenci (Kusaba et al 1997). S ohledem na tyto konzervativní sekvence byly varianty *SLG* genů rozděleny do dvou tříd. Vzájemná podobnost *SLG* genů jednotlivých tříd je přibližně 65 %. *SLG* geny první třídy jsou dominantní nad geny třídy druhé a dále se vyznačují nepřítomností intronů (Okazaki et al 1999). Druhá třída *SLG* genů je charakteristická výskytem 200 bází dlouhého intronu na 3'konci (Hatakeyama et al 1998). Dále byla u *SLG* genů druhé třídy prokázána produkce transkriptu vázaného na buněčnou membránu. U této struktury však nebyla prokázána spojitost s recesivitou těchto genů (Hatakeyama et al 1998).

Od genu *SLG* jsou odvozeny i některé další geny s velice podobnou sekvencí nukleotidů. Dalším společným znakem těchto genů je exprese v prašnicích a povrchové vrstvě blizny a dále se i předpokládá, že se též uplatňují v rozpoznávacích mechanizmech. Tyto geny se však liší umístěním v genomu, jsou totiž lokalizovány

mimo S-lokus. Nazývají se proto jako geny s S-lokusem spřízněné neboli *SLR* geny. Cock et al (1995) definoval takovéto geny jako *SLR1*, *SLR2* a *SLR3*. Poslední jmenovaný gen *SLR3* se částečně vymyká této charakteristice, protože je exprimován nejen v prašnicích a papilárních buňkách blizny, ale i v některých dalších pletivech rostliny (Cock et al 1995).



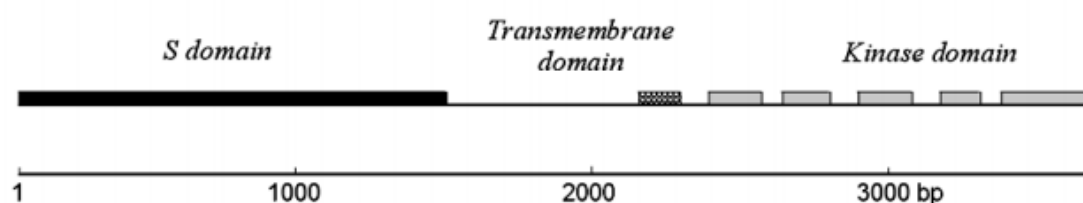
Obr. 1 Struktura *SLG* genu upraveno ze Sobotka et al (2000)

2.3.2 *SRK* gen

SRK gen (S-locus kinasa receptor, identifikován Stein et al 1991) je podobně jako *SLG* gen značně polymorfní a vyznačuje se též expresí pouze v papilárních buňkách zralé blizny. Částečně je též přepisován v prašnicích, nicméně pouze mRNA nikoli však příslušný protein (Stein et al 1991). V dalších tkáních jeho transkripce zaznamenána nebyla (Delorme et al 1995). Jeho klíčová role je podobně jako u *SLG* genů v rozpoznání vlastního pylu rostliny. Jeho expresí vzniká protein vázaný na membránu podílející se na AI reakci rostliny.

Strukturně je *SRK* gen složen ze třech hlavních částí (obr. 2). První část je reprezentována glykosilátovou extracelulární doménou, též nazývanou jako S-doména. Pro tuto doménu je typická značná podobnost s *SLG* genem a to až v 90 %. Kusaba et al (2000) prokázal, že sekvence aminokyselin v S-doméně genu *SRK* je velice podobná mezi S-haplotypy se stejnou rozpoznávací schopností. Tento objev naznačoval klíčovou roli S-domény jako rozpoznávacího faktoru AI. Další výzkum však ukázal na ještě větší podobnost sekvencí aminokyselin mezi *SLG* proteiny rozdílných haplotypů. S-doména též obsahuje 12 konzervativních cysteinových reziduí a dvě konzervativní N-glykosilační místa podobně jako *SLG* gen. Druhou částí je transmembránová doména, která dále pokračuje na kinázovou doménu. Třetí kinázová doména sdílí podobnost s klasickou serin/threonin kinázou

uplatňující se v autofosforylační aktivitě. Ta běžně funguje jako rozpoznávací součást obranného mechanismu proti patogenům. Tento fakt naznačuje možný vznik tohoto genu (Pasteglia et al 1997). Další návrh původu představil Giranton et al (1995), kterému se podařilo nalézt v S3 lokusu *Brassica oleracea* zkrácenou rozpustnou formu *SRK* genu. Tato část kóduje eSRK protein, do kterého je přepisována pouze první část *SRK* genu S-doména. Vznik tohoto proteinu může být vysvětlen například odlišnou úpravou *SRK* transkriptu. Jako velice zajímavý se jeví fakt, že podobné proteiny s kinázovou aktivitou se nacházejí v živočišných signálních drahách jako PDGF receptor a EGF receptor (Giranton et al 1995).



Obr. 2 Struktura *SRK* genu upraveno ze Sobotka et al (2000)

2.3.3 *SCR* gen

SCR gen (S-locus cysteine-rich protein, identifikován Schopfer et al 1999) též *SP11* gen (Suzuki et al 1999) je gen S-locusu hrající klíčovou roli v AI reakci. Někdy je také označován jako samčí determinant autoinkompatibility. Tak jako i předchozí geny je i tento gen velice polymorfní. Konzervativní jsou pouze úseky osmi cysteinových zbytků, které tento gen charakterizují. Zároveň je i v silné genové vazbě s geny *SLG* a *SRK* na S-locusu. Exprese tohoto genu je vázána na prašníky. Přepisem vznikají specifické proteiny pláště pylu, které mají charakteristickou prostorovou strukturu danou konzervativními cysteinovými zbytky. Tento typ proteinů se nazývá PCP (pollen coat protein). Exprese probíhá v buňkách tapetální vrstvy prašníků. Tyto buňky poté produkují protein při vytváření pylu. *SLG* a *SRK* proteinový komplex na zralé blizně disponuje silnou afinitou k PCP proteinům. Pokud je na takovém komplexu zaregistrován vlastní pyl, nedojde k jeho vývoji. Přitom nezáleží na S-haplotypu rostliny (Schopfer et al 1999).

Důkaz o funkčnosti *SCR* genu jako samčího determinanta AI byl získán dvěma různými přístupy. V prvním případě Schopfer et al (1999) transformoval jedince určitého haplotypu genem *SCR* z jiného haplotypu. Následně pak transformované rostliny odmítaly pyl z druhého typu. Druhý pokus byl proveden Takayama et al (2000), který rekombinovaný *SCR* protein z *Escherichia coli* použil na blizně stejného haplotypu a pyl byl odmítnut.

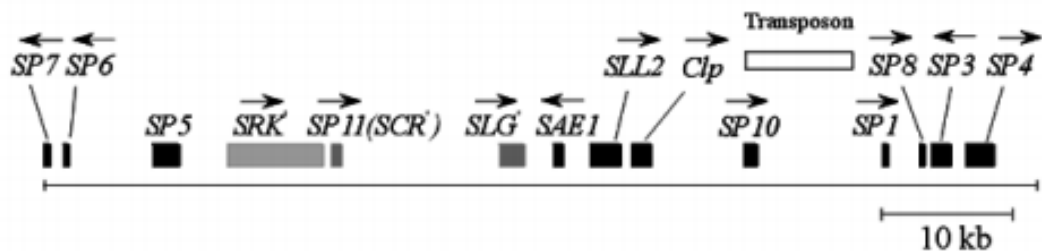
2.3.4. Další S-lokus geny

2.3.4.1 *SLA* gen

SLA gen (S-locus anther, identifikován Boyes & Nasrallah 1995) je dalším významným genem S-lokusu. Exprese tohoto genu byla objevena v prašnicích S2 haplotypu *B. oleracea*. Gen je přepisován ze dvou promotorů a dává vznik dvojici antiparalelních transkriptů. Jeden z těchto transkriptů je dále sestřihán. Podle dvou identifikovaných otevřených čtecích rámců je předpokládáno, že vytváří dva různé proteiny o velikosti 10 kDa a 7,5 kDa (Sobotka et al 2000). Druhý antiparalelní transkript se podílí na vývoji mikrospor a prašníků. U autokompatibilních rostlin *B. napus* transkripty nebyly nikdy detekovány. Nicméně role *SLA* genu u AI reakce rodu *Brassica* není zatím přesvědčivě doložena (Pastuglia et al 1997).

2.3.4.2 Geny *SLL1* a *SLL2*

SLL1 a *SLL2* geny (S-locus binding genes, identifikován Yu et al 1996) jsou specifické geny S-lokusu (obr. 3). Exprese genu *SLL1* byla detekována v prašnicích AI rostlin a měnila se v průběhu vytváření prašníků. Pro gen *SLL2* je typické umístění jak na S-lokusu tak i v jiných částech genomu *Brassica*. Jeho exprese byla objevena v prašnicích, podobně jako *SLL1*, ale i v papilárních buňkách blizny. Na rozdíl od exprese genu *SLL1*, která byla potvrzena pouze u AI rostlin *Brassica*, gen *SLL2* je exprimován i u AK rostlin. Role těchto genů při AI reakci zatím nebyla odhalena (Sobotka et al 2000).

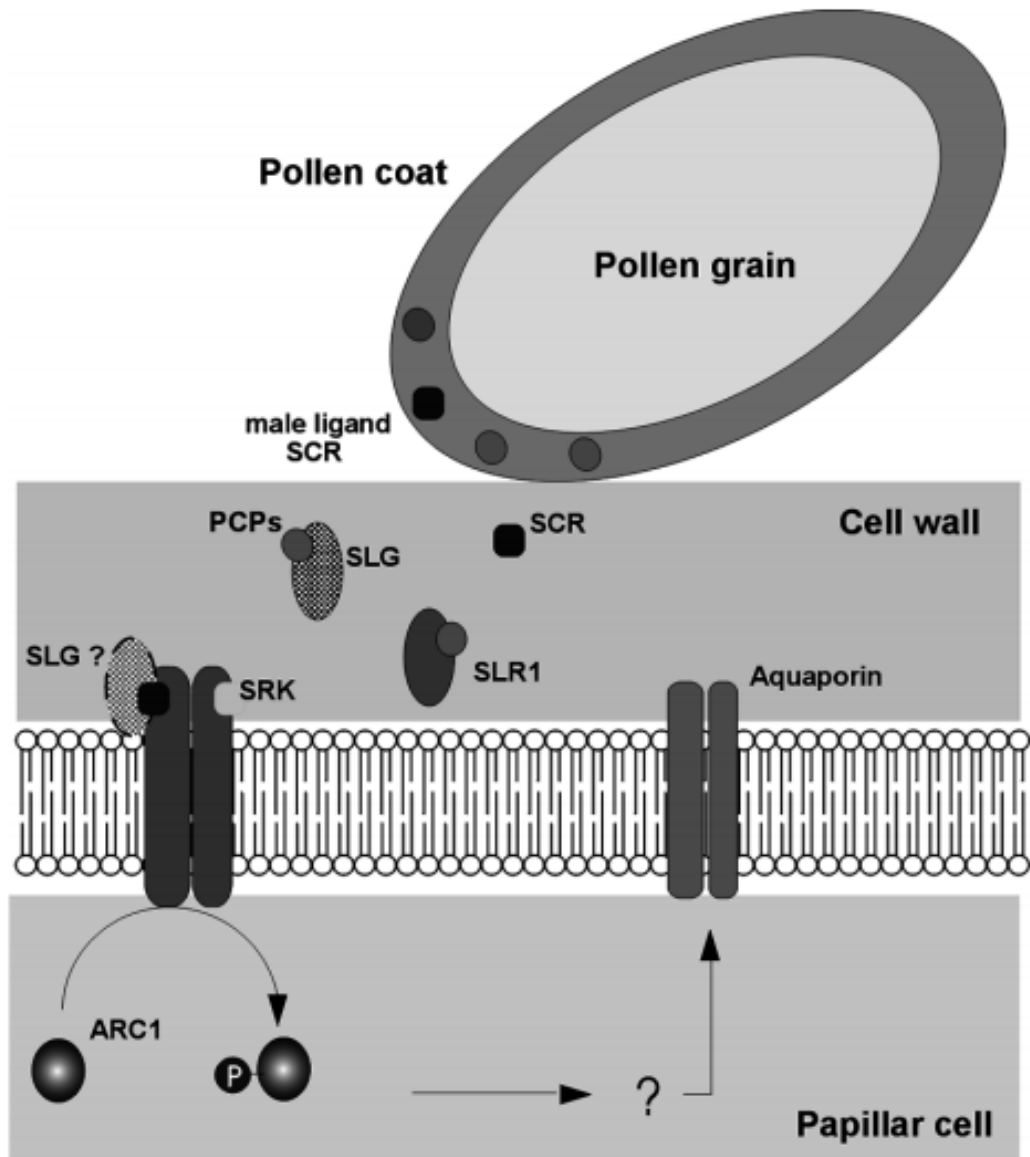


Obr. 3 Genetická mapa 76 kb fragmentu S⁹ haplotypu *Brassica rapa* upraveno Sobotka et al (2000)

2.3.5 Autoinkompatibilní reakce

V případě kontaktu vlastního pylu s bliznou komplex SLG a SRK proteinů zakotvený v membráně papilárních buněk rozpozná specifický SCR protein. Následně proteinový komplex spustí kaskádovou reakci inhibující růst pylového zrna na blizně (obr. 4).

Úspěšné opylení je pro čeleď *Brassicaceae* charakteristické vytvořením spojení mezi pylovým zrnem a bliznou. Toto spojení je realizováno pomocí apresoria, které se vytváří z povrchové vrstvy pylu (Kandasamy et al 1995). Pomocí tohoto spojení je pyl plně hydratován a může se dále rozvíjet. Ruitter et al (1997) prokázal, že řízení průtoku vody z papilárních buněk do pláště pylového zrna je řízeno oleosínovými proteiny. V případě inhibiční reakce vyvolané rozpoznáním vlastního pylu je úplná hydratace pylu znemožněna a pylové zrno se dále nevyvíjí (Sobotka et al 2000).



Obr. 4 Model autoinkompatibilní reakce upraveno Sobotka et al (2000)

2.4 Molekulární DNA markery

Molekulární markery jsou úseky DNA postrádající biologický účinek. Jejich hlavním smyslem je pomocí své vlastní sekvence nukleotidů určovat specifická místa na genomu. Každý molekulární marker má nezaměnitelnou sekvenci, která přesně určuje pozici označení na molekule DNA. Takováto místa se při dělení nemění, pokud nejsou poškozena. Molekulární markery jsou tedy čistě vázány na DNA oproti biochemickým markerům označující specifické proteiny.

Výběr vhodného molekulárního markeru závisí na příslušné analýze. Jiné druhy markerů jsou používány pro RFLP, RAPD, AFLP, SNP a podobně. Pomocí těchto skupin různých molekulárních markerů se u významných ekonomických plodin vytváří velice přesné genetické mapy, které pak mohou být využity pro technologii MAS.

2.5 Technologie MAS

Technologie MAS (marker-assisted selection) je založena na předpokladu, že přítomnost zájmového genu je detekována specifickým markerem. Tento marker se váže ke genu nebo do jeho těsné blízkosti. Čím je vzdálenost mezi cílovým genem a markerem větší, tím je větší nepřesnost identifikace.

Při šlechtění rostlin, můžeme na základě statistických dat a jednotlivých genetických map (vytvořených různými molekulárními markery) přibližně určit, jaký marker je charakteristický pro zájmový znak. Záleží však také na tom, zda je tento znak určen jedním nebo více geny (QTL) případně prostředím. Jedním genem jsou obvykle charakteristické rezistence k určitým chorobám, naopak QTL znaky jsou například velikost, výška a podobně. V závislosti na umístění zájmových genů a jejich markerů rozlišujeme několik typů MAS (Kumar 1999).

- **GAS (gene-assisted selection)**

V tomto případě je molekulární marker přímo lokalizován do genu zájmu. Takovéto markery jsou nejžádanější, protože nezaměnitelně určují gen i po mnoha křížení. Bohužel tento typ je velice vzácný a obtížně se takový marker hledá (Ruane & Sonnino 2007).

- **LD-MAS (linkage disequilibrium marker-assisted selection)**

Častý typ, který je charakteristický těsnou blízkostí genu zájmu a určitého markeru (Ruane & Sonnino 2007).

- **LE-MAS (linkage equilibrium marker-assisted selection)**

Nejhorší případ, kdy je velice těžké použití MAS. Žádný z markerů není identifikován poblíž zájmového genu (Ruane & Sonnino 2007).

Největšího rozvoje MAS technologie došlo u kulturních plodin. Velké zemědělské společnosti s velkým očekáváním vkládaly nemalé finanční prostředky do rozvoje genetických map molekulárních markerů. U velké většiny zemědělských plodin se tak podařilo vytvořit podrobné mapy molekulárních markerů a spojit je s fenotypovými znaky. Po nashromáždění dat se počáteční očekávání zmírnilo, jelikož byla zjištěna nepřesnost v odhadu působení QTL znaků na plodiny. Přesto však použití MAS přinesla mnohé úspěchy a pokroky ve šlechtění zemědělských plodin (Ruane & Sonnino 2007).

2.6 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) je velmi rychlou metodou k získání velkého množství kopií krátkého úseku DNA. Délka amplifikovaného fragmentu obvykle nebývá delší než 10 000 nukleotidů. Výhodou této metody je kromě rychlosti i možnost pracovat s malým množstvím templátové DNA. PCR reakce probíhá v termocyklerech a využívá obdobný mechanismus replikace DNA probíhající v živých buňkách. Začátek a konec amplifikovaného úseku je ohraničen vybranými krátkými úseky komplementární DNA tzn. primery. Samotné přikládání jednotlivých nukleotidů zajišťuje termostabilní Taq polymeráza (Rychlik et al 1990).

Celý proces zahrnuje cyklické opakování (30 – 40krát) třech základních kroků. V prvním denaturačním kroku (20 – 30 sekund, 94 – 98 °C) probíhá rozvolnění DNA dvoušroubovice na jednotlivá vlákna. Druhý krok (30 – 40 sekund, 50 – 65 °C) je charakteristický navázáním primerů a přisednutím DNA polymerázy. V posledním třetím kroku (70 – 85 °C) dochází k samotnému vytváření DNA molekuly Taq polymerázou. Časové rozmezí tohoto kroku závisí hlavně na délce amplifikované DNA (Rychlik et al 1990).

2.6.1 Multiplexová polymerázová řetězová reakce

Multiplexová PCR obsahuje v reakční směsi na rozdíl od klasické PCR více než jeden pár primerů. Výhoda takového řešení je amplifikace více než jednoho úseku DNA v průběhu jedné PCR reakce. Příprava takové multiplexové PCR reakce je ale složitější a komplikovanější, protože jednotlivé kroky a obsah reakční směsi musí vyhovovat všem přítomným primerovým párům. Proto ne každá kombinace primerů je možná. V současnosti je tato metoda často využívána u detekce SSR a SNP (Hayden et al 2008).

2.7 Gelová elektroforéza

Elektroforetické rozdělení makromolekul podle velikosti je klasickou separační metodou, která se používá už velice dlouho. Principem je rozdělení částic s nenulovým elektrickým nábojem podle velikosti. Takové nabité částice jsou například nukleové kyseliny nebo proteiny, které obsahují nabitě fosfátové skupiny resp. nabitě aminokyseliny. Elektroforetická soustava se skládá z nádoby, ve které jsou umístěné z každé strany elektrody. Při průchodu stejnosměrného elektrického proudu nádobou se nabitě makromolekuly pohybují různou rychlostí podle velikosti. Obsahem nádoby jsou různé typy gelů, které podle vnitřní struktury pórů určují rozlišovací schopnost elektroforézy. Rozlišujeme několik typů elektroforézy podle použitého gelu: elektroforéza v agarovém gelu, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a elektroforéza v Synergelu. Kromě gelu je v nádobě ještě pufrovací roztok. Při přípravě gelu se do směsi přidává malé množství ethidiumbromidu (EtBr), který se váže na DNA. Po dokončení procesu se gel umísťuje pod UV světlo, ve kterém DNA s navázaným ethidiumbromidem výrazně září v příslušných pruzích. Alternativní metoda vizualizace DNA v gelu je použití komerčního barviva SYBR Green, případně SYBR Safe. Tyto látky jsou citlivější a netoxické, naopak jejich velkou nevýhodou je vysoká cena (Invitrogen.com – online zdroj).

2.8 Sekvenování DNA

Pod pojmem sekvenování DNA se rozumí metody, pomocí kterých je možné zjistit přesné pořadí nukleotidových bází v zájmovém úseku DNA. Technik sloužící k sekvenaci DNA je několik a liší se hlavně rychlostí zpracování a cenou.

○ **Maxam-Gilbertova metoda**

Tato metoda je založena na chemické reakci DNA na místě určité báze. Krátký úsek DNA je na svém konci radioaktivně označen izotopem fosforu ^{32}P . Následně je vzorek rozdělen a 4 části a štěpen různými látkami (dimethylsulfát, hydrazin, piperidin a NaCl). Různě dlouhé sekvence DNA jsou odděleně separovány gelovou elektroforézou a vizualizovány (Maxam & Gilbert 1977).

○ **Sangerova metoda**

Sangerova metoda též dideoxy metoda se využívá při sekvenaci krátké jednovláknové DNA. V principu využívá proces replikace DNA, který je v určitém místě zastaven. Čtveřice reakčních směsí obsahuje DNA polymerázu, primer a liší se přítomností dideoxyribonukleosidtrifosfátu. K zastavení reakce dochází právě při začlenění této látky polymerázou. Jednotlivé fragmenty jsou separovány na gelové elektroforéze a vizualizovány (Sanger et al 1977).

3. Materiál a metody

Molekulární analýza se stala mocným nástrojem pro šlechtění a cílenou selekci rostlin požadovaných znaků. Například při hledání AI rostlin se používají selekční markery pro geny zajišťující autoinkompatibilitu. Pomocí těchto markerů můžeme už v raných fázích ontogenetického vývoje rostliny selektovat dle šlechtitelského záměru rostliny s požadovanými vlastnostmi.

3.1 Materiál

Pro analýzy byly použity soubory genetických zdrojů řepky využívaných v programech hybridního šlechtění na výzkumném pracovišti rostlinné výroby VÚRV Praha – Ruzyně. Soubory rostlin obsahovaly donory autoinkompatibility, segregující populace dihaploidních AI a AK rostlin, donory CMS systémů *Ogu-INRA* a *Shaan 2A*, udržitele sterility a obnovitele fertility. Při PCR reakcích byly použity primerové páry používané k selekci AI/AK rostlin (tab. 1).

primer	nukleotidová sekvence 5'– 3'	zdroj
PS5	ATGAAAGGCGTAAGAAAAACCTA	Nishio et al. (1996), <i>B. rapa</i>
PS15	CCGTGTTTTATTTAAGAGAAAGAGCT	Nishio et al. (1996), <i>B. oleracea</i>
e	CAGCATCTACTCGAGATTGAC	Brace et al. (1993), <i>B. oleracea</i>
f	AAA(A/C/G)CCATCTCCACTGCAGCT	Brace et al. (1993), <i>B. oleracea</i>
PK1	CTGCTGATCATGTTCTGCCTCTGG	Nishio et al. (1997), <i>B. oleracea</i>
PK4	CAATCCCAAATCCGAGATCT	Nishio et al. (1997), <i>B. oleracea</i>
BnSLG+BrS47	TGTATGGGTTGCCAACAGAG	nepublikovaný, <i>B. rapa</i>
BnSLG-Ws-1	TCGCTAAGGCACCTCTTCTC	nepublikovaný, <i>B. rapa</i>
SLGa F	GATTCTACTTCTCCTGCCT	Zhang et al (2008), <i>B. rapa</i>
SLGa R	ATTACAGTCGCTAAGGCACC	Zhang et al (2008), <i>B. rapa</i>
SCO3 F	TGATGCAGGAACCTTGAAGC	(Zeng et al 2009)
SCO3 R	GAGCATCTTGCATGGAGGTC	(Zeng et al 2009)

Tab. 1 Seznam použitých primerů

3.2 Izolace DNA

DNA se izoluje z děložních lístků nebo plně vyvinutých listů. Listové pletivo odebíráme z čerstvého materiálu nebo materiálu uchovávaného ve zmrazeném stavu. Při dlouhodobém uskladnění držíme rostlinný materiál hluboce zmrazený (– 80 °C), pro krátkodobé uložení postačí teplota – 20 °C. Po dobu zpracování před izolací se snažíme rostlinný materiál uchovávat na ledu při teplotě (0 °C). Následně provádíme izolaci DNA. K té můžeme využít buď některou ze standardních izolačních metod, nebo některou z extrakčních metod s využitím komerčních kitů.

3.2.1 Extrakční metody s pomocí komerčních kitů

3.2.1.1 Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN)

Tento komerční kit je založen na principu purifikace DNA pomocí speciálních kolon. V první fázi dochází na koloně k zachycení polysacharidů, proteinů a dalších

nečistot. Ve druhé fázi se na druhé koloně zachycuje DNA. Ve třetí fázi získanou DNA vymýváme z kolony elučním roztokem (Čurn et al 2012).

3.2.1.2 Izolace DNA pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu (INVITEK)

Metoda využívá unikátní patentované technologie Invisorb®, která umožňuje rychlou a účinnou izolaci kvalitní DNA. Metoda je založena na principu purifikace DNA v kolonách. Podstatou je interakce mezi negativně nabitými fosfátovými skupinami DNA a pozitivně nabitými skupinami na povrchu membrány v koloně, kde se DNA váže a po přečištění se uvolní vhodným elučním pufrům. Vazba nebo naopak uvolnění DNA z kolonky závisí na koncentraci solí a pH použitých pufrů (Čurn et al 2012).

3.2.2 Standardní izolační metody

3.2.2.1 Izolace DNA pomocí CTAB

Tato metoda byla poprvé popsána Williamsem et al (1992). Její hlavní využití je při izolaci většího množství DNA pro AFLP analýzy nebo obecnou standardizaci procesů. Principem této metody je schopnost vazby CTAB k nukleovým kyselinám. Takto vytvořený komplex je při vysoké koncentraci solí rozpustný. Následným zředěním komplex znovu vysráží. Výhodou CTAB je i jeho působení jako detergent, který umožní nukleovým kyselinám uvolnění od membrán a proteinů. Kombinací různé koncentrace solí a rozpouštěním lze získat velké množství čisté DNA.

3.2.2.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)

Metoda v principu totožná s metodou izolace DNA pomocí CTABu, která je navíc obměněna přidáním polyvinylpyrrolidonu. PVP (polyvinylpyrrolidon) se podílí na získání ještě čistší a kvalitnější DNA odstraněním dalších kontaminantů (Čurn et al 2012).

3.3 Postupy použitých izolačních metod

3.3.1 Tissue

Postup:

- Sterilní pinzetou odebrat 50 mg rostlinného materiálu do mikrokumavky
- Homogenizovat v mikrokumavce pomocí třecího tloučku
- K rostlinnému materiálu přidat 40 μ l 0,25 M NaOH
- Mikrokumavky přenést do teploty 100 °C na 30 sekund, poté 5 minut nechat vychladnout při teplotě 0 °C
- Do mikrokumavek přidat 40 μ l 0,25 M HCl a 20 μ l 0,5 M Tris (pH 8) + 0,25 % Nonidet 40
- Mikrokumavky stočit v centrifuze
- V poslední fázi mikrokumavky přenést do teploty 100 °C na 2 minuty, poté přesunout do mrazáku – 20 °C

3.3.2 CTAB

Postup:

- Sterilní pinzetou odebrat 20 – 30 mg rostlinného materiálu do mikrokumavky
- Homogenizovat v mikrokumavce pomocí třecího tloučku
- Namíchat a nahřát na 65 °C roztok 2x CTAB – PVP + 1 % merkaptoethanol
- K rostlinnému materiálu přidat 250 μ l připraveného předehřátého roztoku 2x CTAB – PVP + 1 % merkaptoethanolu
- Inkubovat mikrokumavky ve vodní lázni o teplotě 65 °C po dobu 45 minut
- Cetrifugovat mikrokumavky rychlostí 12 000 otáček za minutu po dobu 10 minut
- Odebrat supernatant do nové mikrokumavky
- Přidat do každé mikrokumavky 250 μ l roztoku chloroformu s IAA
- Přenést na třepačku a třepat po dobu 10 minut
- Cetrifugovat mikrokumavky rychlostí 12 000 otáček za minutu po dobu 5 minut

- Odebrat vodní fázi do nové mikrozkuřavky
- Přidat do každé mikrozkuřavky cca 40 µl 5 % roztoku CTABu
- Přidat 250 µl roztoku chloroformu s IAA
- Přenést na třepačku a třepat po dobu 10 minut
- Cetrifugovat mikrozkuřavky rychlostí 12 000 otáček za minutu po dobu 5 minut
- Přenést vodní fázi do finálních mikrozkuřavek
- Přidat cca 130 µl izopropanolu
- Uložit mikrozkuřavky do mrazáku – 20 °C po dobu 1 – 24 hodin
- Cetrifugovat mikrozkuřavky rychlostí 12 000 otáček za minutu po dobu 10 minut ve vychlazené centrifuze na teplotu 4 °C
- Slít supernatant z mikrozkuřavek a zbylý pelet rozpustit v 300 µl vody
- Přenést na předeřátou třepačku na 37 °C na dobu 30 – 60 minut
- Přidat cca 600 µl ledově vychlazeného 100 % etanolu
- Mikrozkuřavky lehce promíchat a uložit do mrazáku – 20 °C po dobu minimálně 20 minut
- Cetrifugovat mikrozkuřavky rychlostí 12 000 otáček za minutu po dobu 10 minut ve vychlazené centrifuze na teplotu 4 °C
- Odstranit supernatant a přilít 1000 µl 70 – 90 % etanolu
- Mikrozkuřavky promíchat a cetrifugovat rychlostí 12 000 otáček za minutu po dobu 10 minut ve vychlazené centrifuze na teplotu 4 °C
- Odstranit supernatant a zbylý pelet vysušit
- V poslední fázi přidat 50 µl vody a rozpouštět ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37 °C po dobu 40 minut

3.4 Analýzy DNA markerů

3.4.1 Analýza *SLG I*

Tato analýza je zaměřená na detekci vysoce polymorfního genu *SLG* třídy I, který se nachází v S-lokusu *Brassica napus*. Identifikace jeho přítomnosti v analyzovaném vzorku je založena na amplifikaci specifického úseku DNA

o velikosti 1330 bází. Amplifikace se provádí PCR technikou za použití primerů PS5 a PS15 (Čurn et al 2011).

3.4.2 Analýza *SLG II*

Stejnou technikou jako v předchozí analýze se amplifikuje gen *SLG* třídy II. Gen je též lokalizován na S-lokusu, ale je recesivní vůči předchozímu genu. K amplifikaci dochází u specifického úseku o velikosti 1100 bází při použití PS3 a PS21 primerů (Čurn et al 2011).

3.4.3 PCR-RFLP analýza genů *SLG*

PCR-RFLP analýza využívá PCR produkty získané při této reakci s příslušnými specifickými primery S-lokusu (geny *SLG* třídy I a třídy II). Následně jsou produkty PCR rozštěpeny vybranými restriktázami. Výsledné fragmenty jsou dle velikosti rozděleny na gelové elektroforéze (Park et al 2002). Následným porovnáním s katalogem S-haplotypů lze určit, o jaký typ se jedná. Jeden takový katalog pro restriktázu AfaI vytvořil Nishio et al (1996). PCR-RFLP analýza našla uplatnění při detekci polymorfizmů a identifikaci specifických S-haplotypů. Jedná se o rychlou a levnou metodu odlišení S-haplotypů v rané fázi ontogeneze řepky (Čurn et al 2011).

3.4.4 Analýza *SCR II*

Tato analýza se používá pro detekci přítomnosti vysoce polymorfního genu S-lokusu *SCR* též *SP11*. Zjištění přítomnosti se provádí PCR analýzou testovaného vzorku. Amplifikovaný fragment má velikost přibližně 280 bází a k jeho multiplikaci se používají dvojice specifických primerů *SCRIIa* – *SCRIIb*, *SCRII_1a* – *SCRII_1b*, *SCRII_2a* – *SCRII_2b* (Žaludová 2007, Čurn et al 2011).

3.5 Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace DNA v izolátu byl využíván fluorometrický přístroj – QubitTTM Fluorometer

Postup měření:

- Příprava pracovního roztoku smícháním dvou látek z kitu Quant-iTTM Solution a Quant-iTTM buffer v poměru látek 1:200
- Příprava standardního roztoku smícháním 190 μ l pracovního roztoku a 10 μ l standardu
- Příprava roztoku vzorku smícháním 180 – 199 μ l pracovního roztoku a 1 – 20 μ l roztoku DNA
- Po zvortexování a 2 minutové pauze změnit koncentraci přístrojem QubitTTM Fluorometer

3.6 Postup PCR reakce

PCR reakce byla prováděná v objemu 20 μ l za použití komerčního mixu PPP master mix společnosti Top-Bio.

Složení:

150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25 °C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq-DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

Schéma pipetování:

- 10 μ l PPP master mix
- 0,2 μ l BSA
- 0,5 μ l SLGa F + 0,5 μ l SLGa R
- 0,5 μ l SCO3 F + 0,5 μ l SCO3 R
- 1 μ l DNA
- 6,8 μ l H₂O

Amplifikace byla prováděná v termocyklerech GENE PRO s následujícím teplotním schématem:

- | | | |
|-------------------------------|-------|-----------|
| ○ Počáteční denaturační fáze | 95 °C | 3 minuty |
| ○ Opakující se cyklus 35 krát | 94 °C | 30 sekund |
| | 58 °C | 45 sekund |
| | 72 °C | 1 minuta |
| ○ Konečná elongace | 72 °C | 10 minut |
| ○ Zastavení | 4 °C | |

3.7 Elektroforetická separace

Elektroforetické rozdělení DNA fragmentů bylo prováděno v elektroforetické vaně s 1x TBE pufrem (10,8 g Tris, 5,5 g kyseliny borité, 4 ml 0,5 M EDTA, doplněno do 1 l H₂O). PCR roztok byl nanášen do 1,5 % agarového gelu s ethidiumbromidem (250 ml TBE, 2,5 g agarózy a 5 µl 1 % ethidiumbromidu). Okrajové sloty byly vyplněny 100 bp DNA ladderem. Na elektroforéze byl prvních 10 minut nastaven proud na velikost 40 V, poté byla jeho hodnota změněna na 80 V. Celá separace probíhala obvykle kolem 3 hodin. Pro vizualizaci rozdělených DNA fragmentů byla využita vlastnost ethidiumbromidu navázaného na DNA zářit v UV světle. Výsledný gel byl ozářen UV světlem a vyfocen fotoaparátem ve fotokomoře. Tyto snímky byly poté přeneseny do počítače, kde byly softwarově upraveny a vyhodnoceny.

4. Výsledky

4.1 Izolace DNA

V rámci zadaného úkolu diplomové práce bylo hodnoceno několik způsobů izolace DNA z listového pletiva řepky. Vzhledem k tomu, že bylo nutné zpracovat velké množství vzorků, byl hlavní zřetel dán především na technickou proveditelnost a finanční nenáročnost. Dále byla posuzována schopnost získané DNA amplifikovat při PCR reakci a konstantní koncentrace získané DNA. Ukázka posouzení koncentrace DNA u jednotlivých metod je uvedena v tabulce 2 – metoda tissue s navážkou cca 20 mg, tabulce 3 – metoda CTAB s navážkou cca 25 mg a tabulce 4 – metoda tissue s navážkou cca 50 mg.

označení rostliny	obsah DNA [ng/μl]
244	67,3
256	4,35
262	17,3
273	4,47
299	7,85
304	19,6

Tab. 2 metoda tissue s navážkou cca 20 mg

označení rostliny	obsah DNA [ng/μl]
20	57,5
21	36,9
22	19
24	31,8
27	69,1
159	81,3

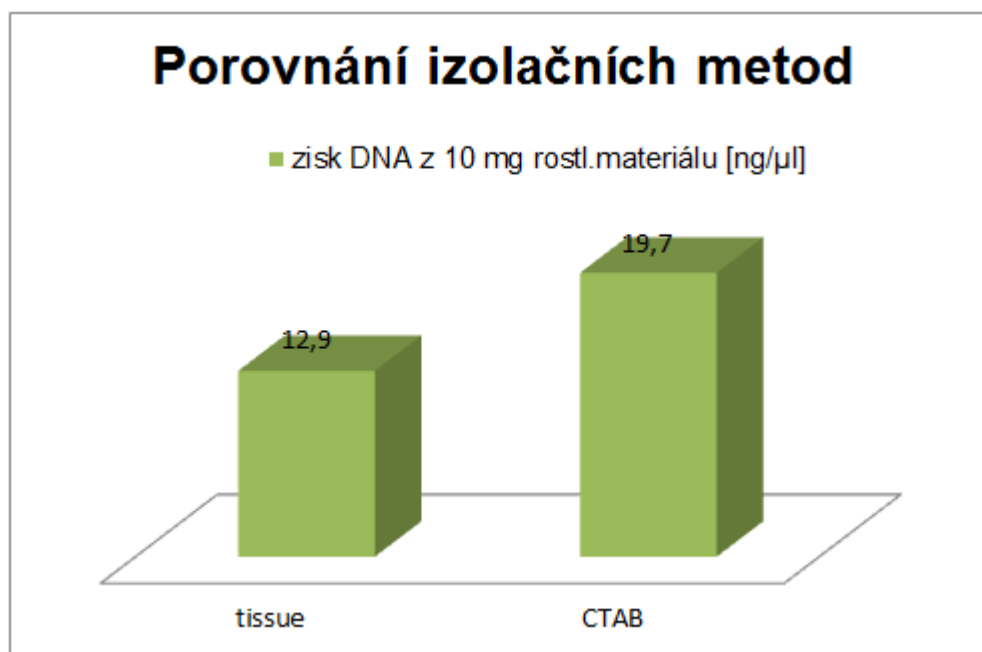
Tab. 3 metoda CTAB s navážkou 25 mg

označení rostliny	obsah DNA [ng/μl]
517	74,8
570	81,4
596	74,4
597	110

Tab. 4 metoda tissue s navážkou cca 50 mg

metoda	množství rostlinného materiálu [mg]	průměrný obsah DNA [ng/μl]	zisk DNA z 10 mg rostl.materiálu [ng/μl]
tissue	20	25,7	12,9
CTAB	25	49,3	19,7

Tab. 5 Porovnání izolačních metod



Graf. 1 Porovnání izolačních metod

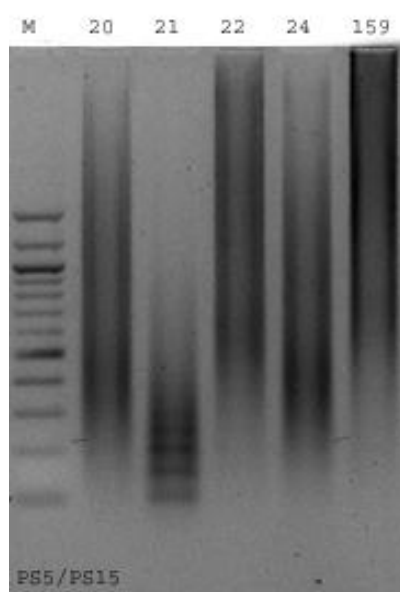
V rámci práce byly hodnoceny metody izolace DNA pomocí komerčních kitů DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN), Invisorb Spin Plant Mini Kitu (INVITEK), standardní metody CTAB a její zrychlené alternativy a rychlé metody tissue. V tabulce 5 a Grafu 1 je porovnán zisk z metod tissue a CTAB. Po zhodnocení veškerých kritérií byla vybrána metoda izolace CTAB.

4.2 Testování vhodných primerů

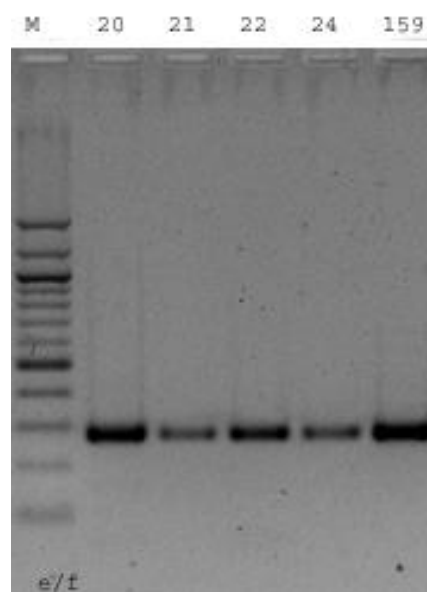
Při hodnocení vhodného páru selekčních primerů pro odlišení AI/AK rostlin byly vybrány reprezentativní AI a AK rostliny. Po izolaci jejich DNA byly v následné PCR reakci použity různé páry primerů:

- Obr. 5 primerový pár PS5/PS15
- Obr. 6 primerový pár e/f
- Obr. 7 primerový pár PK1/PK4
- Obr. 8 primerový pár Bn47Br F / Bn47Br R

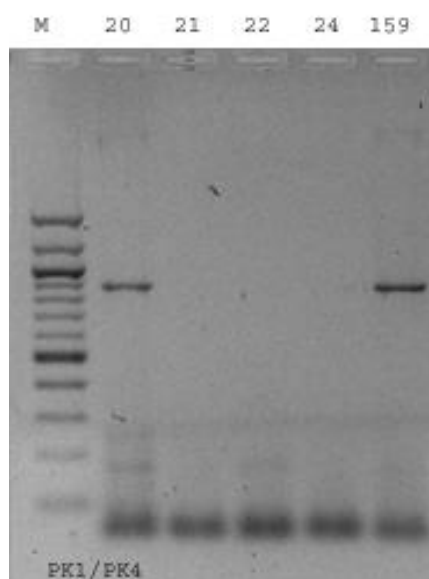
Dále byly také testovány různé podmínky PCR reakce a kombinace více primerových dvojic. Jako AI jsou na přiložených obrázcích označeny rostliny 21, 22 a 24. Zbylé dvě rostliny 20 a 159 představují zástupce autokompatibilních rostlin (AK). Nejlepšího selekčního výsledku bylo dosaženo při použití primerového páru SLGa, který byl doplněn ještě párem SCO3 pro ověření PCR reakce (obr. 9).



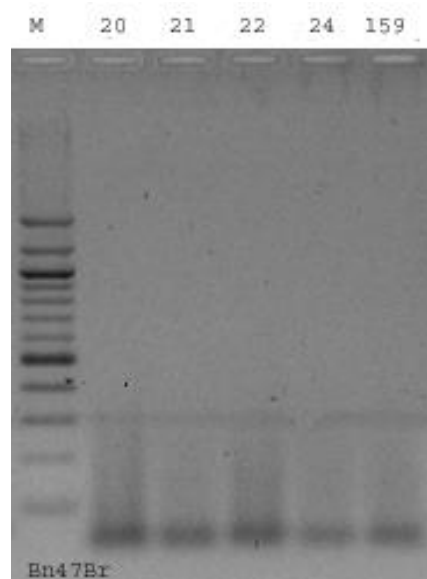
Obr. 5 primerový pár PS5/PS15



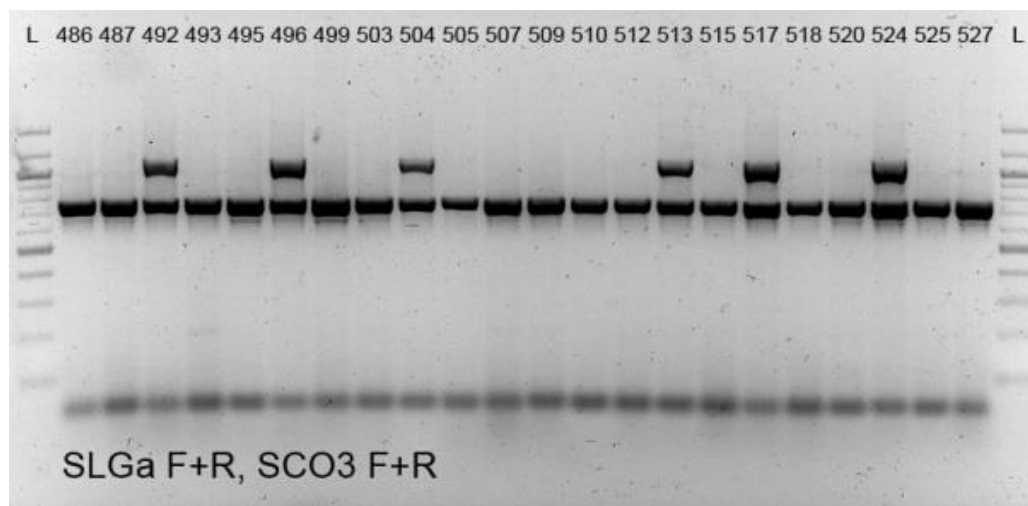
Obr. 6 primerový pár e/f



Obr. 7 primerový pár PK1/PK4



Obr. 8 pár BnSLG+BrS47/BnSLG-Ws-1



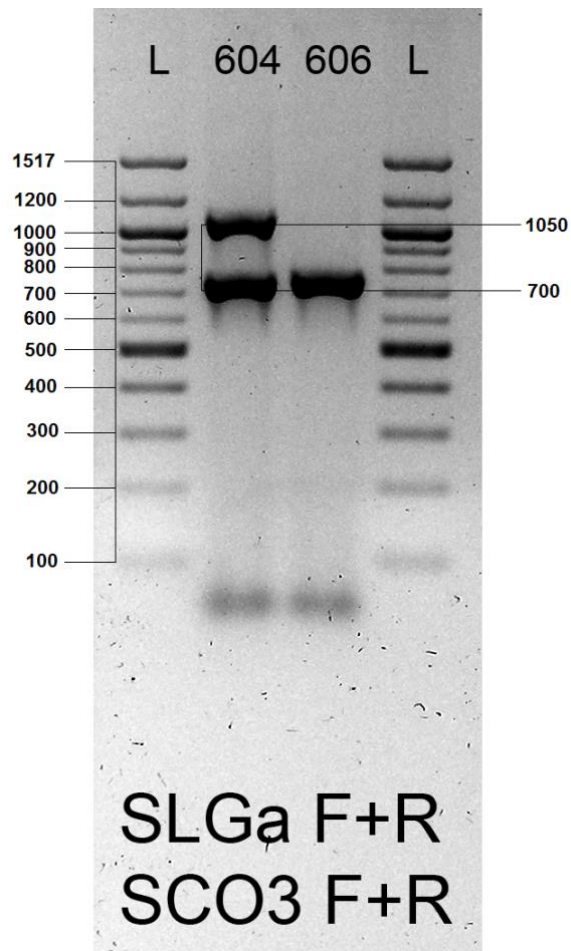
Obr. 9 Multiplex SLGa a SCO3

4.3 Molekulární selekce AK rostlin

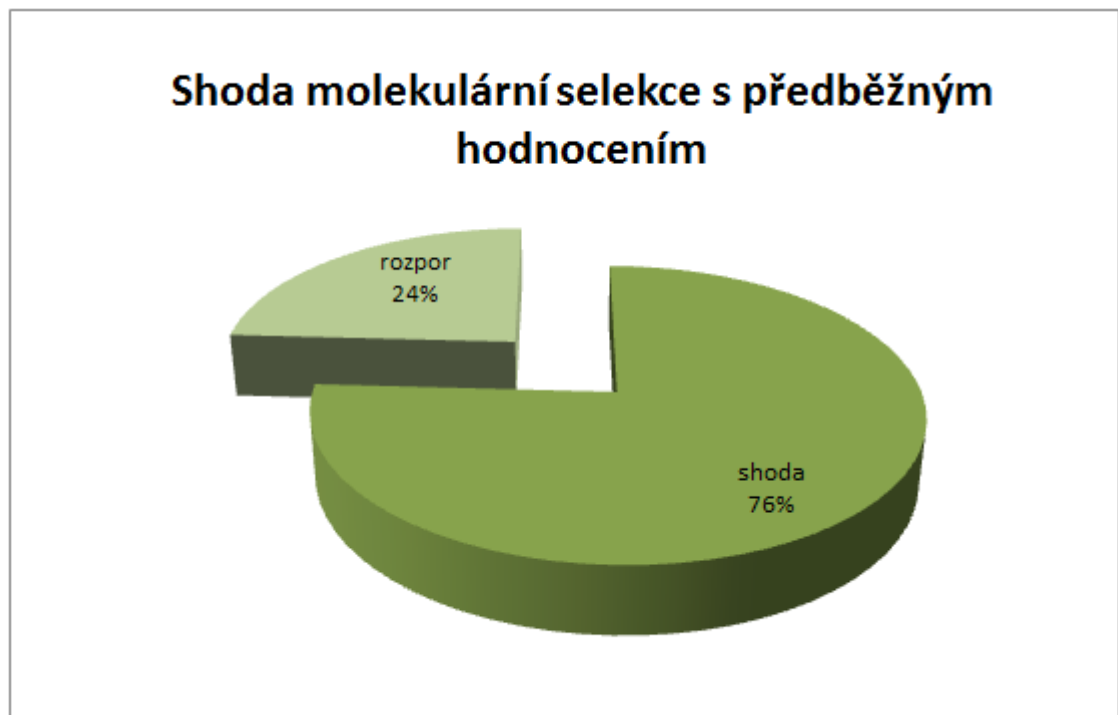
V rámci diplomové práce bylo z kombinovaného souboru AI a AK rostlin vybrána množina 176 rostlin. U těch rostlin byl fenotypovým zkoumáním určen přibližný AI/AK status (příloha 2). K molekulárnímu rozlišení AI/AK rostlin byl využit markerový *SLG* gen. Ze širokého spektra primerů tohoto genu byla na základě kombinovaného testování vybrána dvojice primerů SLGa F a SLGa R (Zhang et al 2008). Tato dvojice SLG primerů ohraničuje úsek přibližné velikosti 1050 bp selekčního genu *SLG*. Tato amplifikovaná část DNA na gelu je považována za výběrový znak genomu AK rostlin.

Dvojice primerů SLGa byla doplněna ještě párem primerů SCO3 F a SCO3 R (Zeng et al 2009). Tyto primery ohraničují úsek DNA o velikosti 700 bp bez ohledu na kompatibilitu rostlin (obr. 10). Tímto komplexem 4 primerů je zajištěna selekce AK rostlin (fragment o velikosti 1050 bp), kontrola přítomnosti dostatečného množství DNA a ověření správného průběhu PCR reakce (fragment o velikosti 700 bp).

Z celkového počtu 176 rostlin bylo na základě komplexu vybraných primerů selektováno 49 AK rostlin, zbylým 127 byl přiřazen AI status. Při porovnání předběžného hodnocení s molekulární selekcí došlo ke shodě u 76 % rostlin (graf 2).



Obr. 10 Kombinace primerů SLGa F+R a SCO3 F+R selektivního genu *SLG*



Graf. 2 Vyhodnocení podobnosti mezi molekulární selekcí a předběžných hodnocením rostlin

5. Diskuze

5.1 Porovnání jednotlivých metod izolace DNA

Výběr jednotlivé metody závisí na mnoha faktorech a především na požadavku konkrétní šlechtitelské stanice. Ideální metoda izolace DNA by měla být jednoduše proveditelná a ekonomicky nenáročná. Nezanedbatelným faktorem je také časová náročnost. Nejdůležitější však je, aby vybraná metoda poskytovala dostatečné množství čisté DNA pro konkrétní využití. Proto je třeba se na výběr vhodné izolační metody dívat ze všech možných úhlů a zvolit v rámci optimalizace celého procesu tu nejvhodnější.

Podle vypracované metodiky Čurn et al (2011) porovnávající všechny uvedené metody izolace DNA pro rozlišení AI a AK se autorům zdála nejlepší volbou izolace pomocí Inisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK). Vysoká cena tohoto kitu je v tomto případě vyvážena standardizací DNA vzorků a opakovatelností i při rozdílnosti rostlinného materiálu.

V rámci diplomové práce byl hodnocen podobný seznam metod izolace DNA jako u předchozích autorů – izolace DNA pomocí komerčních kitů DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN), Invisorb Spin Plant Mini Kitu (INVITEK) a standardní metody CTAB. Navíc byly začleněny i některé další zrychlené a finančně nenáročné metody CTAB a metoda tissue. Izolační metody pomocí dvou zmíněných komerčních kitů poskytovaly čistou DNA o konstantní koncentraci. Zároveň je jejich velkým plusem také časová nenáročnost. Naopak obrovským mínusem jsou finanční náklady při zpracovávání velkého počtu vzorků. Takovéto metody jsou vhodné spíše jako rychlé a univerzální metody izolace různých rostlinných pletiv při malém počtu vzorků. Metoda izolace CTAB poskytovala velice čistou DNA o konstantní

koncentraci. Získaná DNA také výborně amplifikovala při navržené PCR reakci. Další výhodou této metody byla i její finanční nenáročnost. Jediným podstatným mínusem je časová náročnost tohoto postupu, který obvykle zabere dva dny pro jednu sadu vzorků. Alternativní zrychlené metody CTAB a rychlá metoda tissue tuto nevýhodu nemají. Obvykle jsou tyto metody velice rychlé a také finančně nenáročné. Jejich nevýhodou však je, že ne vždy poskytují dostatečně koncentrovanou a čistou DNA. Takto získaná DNA ne vždy správně amplifikuje při PCR reakci.

5.2 Výběr vhodných primerů

5.2.1 Primerový pár PS5/PS15

Dle studie Zhang et al (2008) specifický primerový pár PS5/PS15 třídy I genu *SLG* vyštěpoval fragment o délce přibližně 1300 bp u AK rostlin, u AI rostlin nedocházelo k žádné amplifikaci. Nevýhodou tohoto páru byla neschopnost amplifikovat tento fragment u všech AK rostlin z populace AK rostlin s S-haplotypem „Defender“. U některých jedinců docházelo ke tvorbě nerozlišitelných fragmentů a selekce pomocí těchto primerů nebyla spolehlivá. V našem případě při použití primerového páru PS5/PS15 docházelo k vytváření nespecifického pozadí bez jasně zřetelných pruhů u AK i AI rostlin (obr. 5). Problém mohl být způsoben odlišnou nukleotidovou sekvencí primerových míst, případně Brace et al (1994) navrhoval, že neschopnost stabilní amplifikace při použití PS5/PS15 může odrážet jejich heterozygotnost rostlin.

5.2.2 Primerový pár e/f

Podle našich pokusů tento primerový pár amplifikoval jeden výrazný fragment o přibližné velikosti 290 bp (obr. 6). Po následném štěpení tohoto úseku, dokázaly výsledné fragmenty AK/AI rostliny. V některých případech byl však tento pár nespolehlivý a zároveň použití tohoto primerového páru by bylo finančně i časově náročnější než u ostatních testovaných primerů (Möhring et al 2005). Autoři Zhang et al (2008) pozorovali u všech rostlin amplifikaci více než jednoho fragmentu,

s nespolehlivostí rozlišení AK/AI rostlin podobně jako v naší studii. Takovéto výsledky mohou být způsobeny vysokou podobností míst pro použité primery (Zhang et al 2008).

5.2.3 Primerový pár PK1/PK4

Dle studie autorů Nishio et al. (1997) tento pár primerů amplifikuje u AK rostlin fragment o délce 900 – 1000 bp. Naopak jiné studie při použití odlišných odrůd tyto výsledky nepotvrdily. Při použití primerového páru nedocházelo k vyštěpení stejně dlouhých fragmentů, ale k vytváření nespecifického pozadí. Ani po změně podmínek PCR reakce nedošlo k amplifikaci stejně dlouhých fragmentů. Autoři navrhují, že problém by mohl být způsoben odlišnou nukleotidovou sekvencí primerových míst, případně přílišnou délkou prvního nebo třetího intronu (Zhang et al 2008). V našem případě podobně jako v práci Nishio et al. (1997) docházelo k amplifikaci fragmentu o velikosti 900 bp u AK rostlin (obr. 7). Tento pár primerů se pro testovaný soubor genotypů dal použít jako vhodný selekční marker AK rostlin. Dokonce samostatně podával i ostřejší pruhy než nakonec vybraný pár SLGa. V našem případě jsme k jeho použití nepřistoupili z důvodu absence vhodného páru do multiplexové PCR reakce.

5.2.4 Primerový pár BnSLG+BrS47/BnSLG-Ws-1

Jedná se o navržený nepublikovaný primerový pár, který postihuje úsek genu *SLG I* haplotypu S-47 z *B. rapa*. Příslušné číslo v NCBI je AB054705.1. Jeho předpokládaná délka je 912 bp. Při použití tohoto páru došlo k neselektivní slabé amplifikaci fragmentu o velikosti cca 300 bp (obr. 8). Odlišit AK/AI rostliny pomocí tohoto primerového páru se nepodařilo.

5.2.5 Primerový pár SLGa F/SLGa R

Primerový pár SLGa byl navržen z SLG-A10 a identifikuje S haplotyp AK rostlin *B. napus*. Tento pár byl testován na AK odrůdě „Defender“ nesoucí S-47 haplotyp třídy I přenesený z *B. rapa* (Zhang et al 2008). Následná sekvenace

vyštěpeného fragmentu prokázala 97 % shodu s nukleotidovou sekvencí v S-47 haplotypu. Z SLG-A10 byly ještě dále odvozeny primerové páry SLGb a SLGc (Zhang et al 2008). Primerový pár SLGa vyštěpuje fragment o velikosti 1099 bp, SLGb fragment 901 bp a SLGc fragment 805 bp u AK rostlin (příloha 3).

Schopnost primerového páru SLGa identifikovat AK rostliny byla prokázána na odrůdách SI1300 (AI) a Defender (AK). Při vzájemném křížení těchto dvou odrůd byla schopnost SLGa ověřena na potomcích F_3 a BC_1F_2 . Při naší studii byl primer SLGa vyhodnocen jako nejlepší selekční marker. Podobně jako ve studii Zhang et al (2008) i u naší odrůdy výborně identifikoval AK rostliny fragmentem o velikosti cca 1050 bp. SLGa byl dále doplněn primerovým párem SCO3 (obr. 9) ze studie Zeng et al (2009). Tento pár spolehlivě amplifikuje fragment o velikosti 700 bp u všech rostlin a navíc je ideální v kombinaci s SLGa, byl vybrán asi z 15 potenciálních primerových párů k ověření PCR reakce.

5.3 Molekulární selekce

Ze souboru 176 rostlin bylo na základě molekulární selekce s využitím dvojice primerů SLGa (Zhang et al 2008) a SCO3 (Zeng et al 2009) vyselektováno 49 autokompatibilních (AK) rostlin (příloha 1). Ostatní rostliny o počtu 127 byly považovány za AI. Při porovnání vyhodnocení pomocí selekčních markerů a předběžného hodnocení na základě fenotypových znaků došlo ke shodě u 76 % hodnocených rostlin (graf 2). Téměř čtvrtinový rozkol lze vysvětlit možným špatným určením rostlin na základě fenotypu. Nemalý vliv byl jistě též způsoben nedostatečnou izolací pěstovaných rostlin, které byly izolovány od okolního prostředí skleníkem. Uvnitř skleníku však rostliny nebyly opatřeny izolátory, které by jistě ještě více zamezily cizosprašení mezi testovanými rostlinami. Dále se domníváme, že k porušení autoinkompatibility mohlo dojít na základě špatných podmínek. Při kvetení této skupiny rostlin totiž panovaly vysoké teploty, které mohou porušit mechanismus rozpoznávání vlastního pylu (Kučera – osobní sdělení).

6. Závěr

V rámci diplomové práce byl testován široký rozsah izolačních metod DNA z listového pletiva řepky *B. napus*. Vzhledem k tomu, že požadavky na izolační metodu byly hlavně technická proveditelnost, spolehlivost a finanční nenáročnost, byla vybrána sice časově náročná, ale spolehlivá a levnější metoda CTAB. Tato metoda poskytla dostatečně kvalitní a čistou DNA o stabilní koncentraci. Zároveň takto získaná DNA byla vhodná pro kombinované PCR reakce.

Autoinkompatibilita u druhu *Brassica napus* je řízena sporofyticky. Nicméně určitý vliv neschopnosti samosprášení lze také připsat podmínkám prostředí a fyziologickému stavu rostliny (Sakamoto et al 2000). V rámci naší studie jsme se zaměřili na odhalení AI rostlin pomocí selekčních markerů. Porovnáním všech dostupných primerových párů používaných k selekci autoinkompatibility jsme vybrali dvojici primerových párů SLGa a SCO3. Primer SLGa navržený ve studii (Zhang et al 2008) spolehlivě rozpoznal autokompatibilní rostliny v rámci našich genetických zdrojů. Druhý primerový pár SCO3 ze studie Zeng et al (2009) výborně spolupracoval v multiplexové PCR s primerem SLGa a jeho začleněním jsme dokázali ověřit správné proběhnutí PCR reakce u každého vzorku. V rámci našich genetických zdrojů jsme prokázali, že dvojice párů SLGa a SCO3 spolehlivě a zároveň nízkou finanční náročností dokáže rozlišit AK/AI rostliny. Jistě bude tato dvojice dobrou volbou i pro další maker-asistovanou selekci u hybridních odrůd řepky *B. napus*.

7. Seznam použité literatury

Baranyk P. & Fábry A. (2007): Řepka: pěstování, využití, ekonomika, 1. vyd, česky, Profi Press, Praha, 208 stran

Boyes D.C. & Nasrallah J.B. (1995): An anther-specific gene encoded by an S-locus haplotype of *Brassica* produces complementary and differentially regulated transcripts. *Plant Cell*. 7: 1283 – 1294

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

Brace J., Rydes C.D. & Ockendon D.J. (1994): Identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. *Euphytica*. 80: 229 – 234

Cock J.M., Stanchev B., Delorme V., Croy R.R.D. & Dumas CH. (1995): *SLR3*: a modified receptor kinase gene that has been adapted to encode a putative secreted glycoprotein similar to the S-locus glycoprotein. *Mol. Gen. Genet*. 248: 151 – 161

Čurn V., Kukolíková B., Havlíčková L. & Žaludová J. (2011): Metodika detekce a molekulární selekce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.), Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

Čurn V., Havlíčková L., Vondrášková E., Kučera V., Vyvadilová M. & Klíma M. (2012): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity, Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

Delorme V., Giranton J. L., Hatzfeld Y., Friry A., Heizmann P., Ariza M. J., Dumas C., Gaude T. & Cock J.M. (1995): Characterization of 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

Downey R.K. & Rakow G.F.W. (1987): Rapeseed and mustard. In: principles of cultivar development. W.R. Fehr, eds. (New York: Macmillan). p. 437 – 486

Downey R.K. (1990): *Brassica* oilseed breeding: achievements and opportunities. *Plant Breed. Abstr.* 60, 1165 – 1170

Gaude T., Rougier M., Heizmann P., Ockendon D.J. & Dumas C. (1995): Expression level of the *SLG* gene is not correlated with the self-incompatibility phenotype in the class II S-haplotypes of *Brassica oleracea*. *Plant Mol. Biol.* 27: 1003 – 1014

Giranton J.L., Ariza M.J., Dumas C., Cock J.M. & Gaude T. (1995): The S-locus receptor kinase gene encodes a soluble glycoprotein corresponding to the *SRK* extracellular domain in *Brassica oleracea*. *Plant J.* 8: 101 – 108

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

Grelon M., Bugar F., Bonhomme S. & Pelletier G. (1994): Ogura cytoplasmatic male sterility cms associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male sterile *brassica* cybrids *mog gen gent* 243: 540 – 547

Hatakeyama K., Takasaki T., Watanabe M. & Hinata K. (1998): Molecular characterization of S-locus genes, *SLG* and *SRK*, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica rapa* L. *Genetics.* 149: 1587 – 1597

Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A. & Chalmers K.J. (2008): Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9: 80

Hejny S. & Slavik B. (2003): Květena ČR, díl 3, Academia, Praha, 542 str.

Hiscock S.J. & Dickinson H. G. (1993): Unilateral incompatibility within *Brassicaceae*: further evidence for involvement of the self-incompatibility (S) Locus. *Theor. Appl. Genet.* 86: 744 – 753

Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J., Kubát K & Štěpánek J. (2002): Klíč ke květeně České republiky

Hu S.W., Yu C.Y. & Zhao H.X. (2000): The discovery of a new kind of male sterility accession in *Brassica napus* L. and a primary genetic study. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* 9, 90 – 94

Chase C.D. (2006): Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial – nuclear interactions, *Trends in Genetics* Vol. 23 No. 2

Kandasamy M.K., Paolillo D.J., Faraday C.D., Nasrallah J.B. & 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

Kumar L.S. (1999): DNA markers in plant improvement: An overview *Biotechnology Advances* Volume 17, Issues 2–3, September 1999, Pages 143 – 182

Kusaba M., Nishio T., Satta Y., Hinata K. & Ockedon D. (1997): Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I *SLG* alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7673 – 7678

Kusaba M., Matsushita M., Okazaki K., Satta Y. & Nishio T. (2000): Sequence and structural diversity of the Slocus genes from different lines with the same self-recognition specificities in *Brassica oleracea*. *Genetics.* 154: 413 – 420

Li S.L., Qian Y.X. & Wu Z.H. (1985): Genetic study on genic male sterility and its utilization in *Brassica napus* L. *Acta Agriculturae Shanghai* 1, 1 – 12

Li X.Q., Jean M., Landry B.S. & Brown G.G. (1998): Restorer genes for different forms of *Brassica* cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10032 – 10037

Lu G.Y., Yang G.S. & Fu T.D. (2004): Molecular mapping of a dominant genic male sterility gene Ms in rapeseed (*Brassica napus*) *Plant Breeding* 123, 262 – 265

Maxam A.M. & Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (2): 560 – 4

Möhring S., Horstmann V. & Esch E. (2005): Development of a molecular CAPS marker for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different S alleles. Plant Breed 124: 105 – 110

Nasrallah J.B., Nishio T. & Nasrallah M.E. (1991): The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 393 – 422

Nasrallah J.B., Rundle S.J. & Nasrallah M.E. (1994): Genetic evidence for the requirement of *Brassica oleracea* S-locus receptor kinase in the self-incompatibility response. Plant J. 5: 373 – 384

Nishio T., Kusaba M., Sakamoto K. & Ockendon D.J. (1997): Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (*SRK*) in *Brassica oleracea* L. Theor Appl Genet 95: 335 – 342

Nishio T., Kusaba M., Watanabe M. & Hinata K. (1996): Registration of S-alleles in *Brassica campestris* L. by the restriction fragment sizes of *SLGs*. Theor Appl Genet 92: 388 – 394

Nou I., Watanabe M., Isogai A. & Hinata K. (1993): Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. Sex. Plant Reprod. 6: 79 – 86

Ogura H. (1968): Studies on the male sterility in Japanese radish with special reference to the utilization of this male sterility towards the practical raising of hybrid seed. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ., 6 (2), 39 – 78

Okazaki K., Kusaba M., Ockendon D.J. & Nishio, T. (1999): Characterization of S-tester lines in *Brassica oleracea*: polymorphism of restriction length of *SLG* homologues and isoelectric points of S-locus glycoproteins. Theor. Appl. Genet. 98: 1329 – 1334

- Park J.I., Lee S.S., Watanabe M., Takahata Y. & Nou I.S. (2002):** Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 121: 192 – 197
- Pastuglia M., Ruffio-Chable V., Delorme V., Gaude T., Dumas C. & Cock J.M. (1997):** A functional S-locus anther gene is not required for the self-incompatibility response in *Brassica oleracea*. *Plant Cell*. 9: 2065 – 2076
- Ruane J. & Sonnino A. (2007):** Marker-assisted selection as a tool for genetic improvement of crops, livestock, forestry and fish in developing countries, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2007
- Ruiter R.K., Eldik G.J., Herpen R.M.A., Schrauwen J.A.M. & Wullems G.J. (1997):** Characterization of oleosins in the pollen coat of *Brassica oleracea*. *The Plant Cell*. 9: 1621 – 1631
- Rychlik W., Spencer W.J. & Rhoads R.E. (1990):** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Res* 18 (21): 6409 – 6412
- Sakamoto K., Kusaba M. & Nishio T. (2000):** Single-seed PCR-RFLP analysis for the identification of F1 hybrid cultivars of broccoli and cabbage. *Plant Cell Rep* 19: 400 – 406
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12): 5463 – 7
- Schopfer C.R., Nasrallah M.E. & Nasrallah J.B. (1999):** The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*. 286: 1697 – 1700
- Snowdon R., Lühs W. & Friedt W. (2007):** Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Volume 2, 2007, pp 55 – 114 chapter 4 Oilseed Rape
- Sobotka R., SÁKOVÁ L. & ČURN V. (2000):** Molecular Mechanisms of Self-Incompatibility in *Brassica* *Curr. Issues Mol. Biol.* (2000) 2(4): 103 – 112
- Suzuki G., Kai N., Hirose T., Fukui K., Nishio T., Takayama S., Isogai A., Watanabe M. & Hinata, K. (1999):** Genomic organization of the S-locus:

identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*), *Genetics*. 153: 391 – 400

Stein J. C., Howlett B., Boyes D. C., Nasrallah M. E. & Nasrallah J. B. (1991): Molecular cloning of putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 8816 – 8820

Takayama S., Shiba H., Iwano M., Shimosato H., Che F.S., Kai N., Watanabe M., Suzuki G., Hinata K. & Isogai, A. (2000): The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 1920 – 1925

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

Wang H., Tang X.H. & Zhao Z.X. (2001): Genetic study on ecotype genetic male sterile of H90s in *Brassica napus* L. *Chinese J. Oil Crop Sci.* 23, 11 – 15

Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1992): Genetics analysis using RAPD markers. *Method Enzymol.* 260: 335 – 348

Yu K., Schafer U., Glavin T.L., Goring D.R. & Rothstein S. (1996): Molecular characterization of the S-locus in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *Plant Cell*. 8: 2369 – 2380

Zehnálek P. (2012): Seznam doporučených odrůd řepka olejka 2012, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad

Zeng F., Yi B., Tu J. & Fu T. (2009): Identification of AFLP and SCAR markers linked to the male fertility restorer gene of polCMS (*Brassica napus* L.) *Euphytica* (2009) 165: 363 – 369

Zhang X., Ma Ch., Fu T., Li Y., Wang T., Chen Q., & Tu J. Shen J. (2008): Development of SCAR markers linked to self-incompatibility in *Brassica napus* L., Mol Breeding 21: 305 – 315

Zhao H.X., Li Z.J., Hu S.W., Sun G.L., Chang J.J. & Zhang Z.H. (2010): Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by a multiplex PCR assay, Theoretical and Applied Genetics, Volume: 121, Issue: 4, Pages: 643 – 650

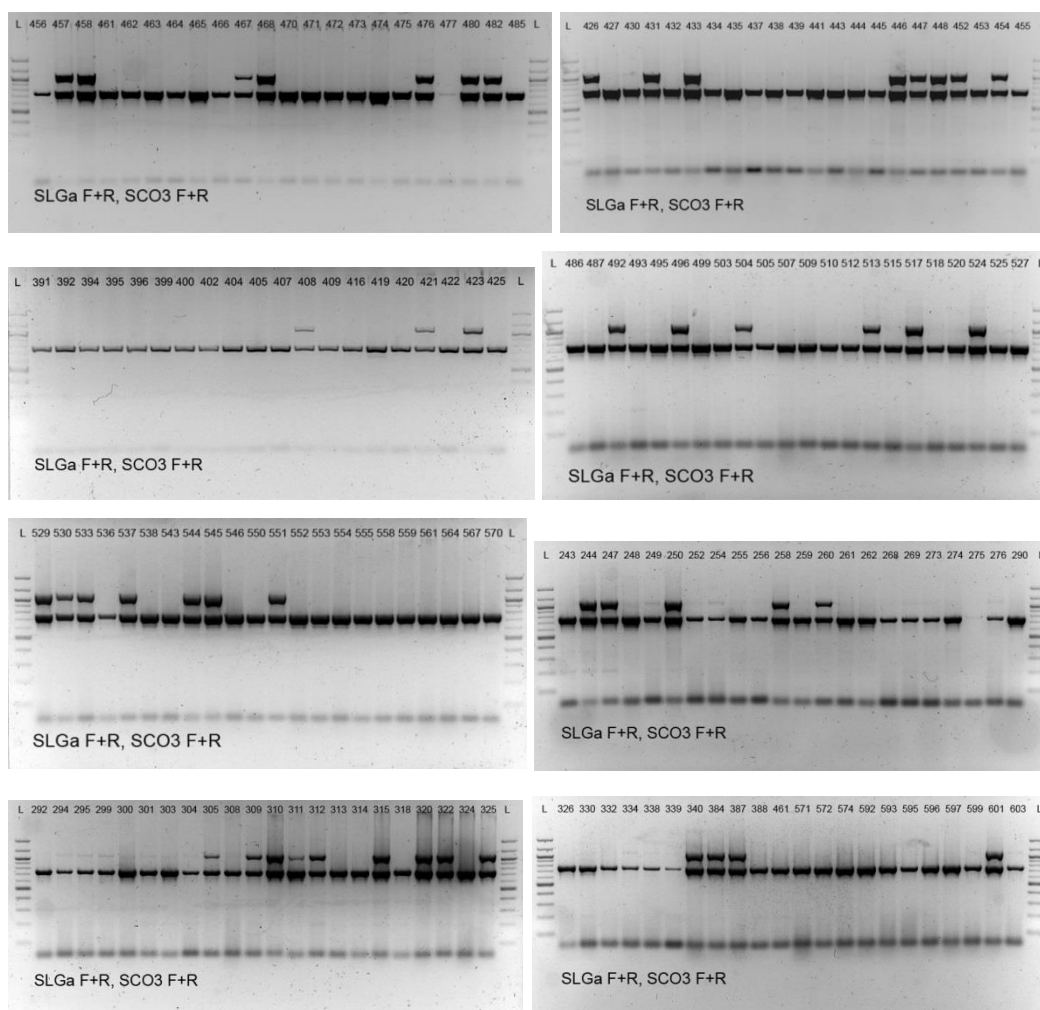
Žaludová J. (2007): The structure and the function of the S-lokus in oilseed rape (*Brassica napus* L.) dizertační práce – JU ZF, České Budějovice

Online zdroje:

Invitrogen.com <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07567.pdf>

8. příloha

Příloha 1 Rozlišení AK/AI rostlin dvojicí primerů SLGa a SCO3



Příloha 2 Tabulka porovnání předběžného fenotypového určení s molekulárním vyhodnocením

označení rostliny	předběžné hodnocení	molekulární vyhodnocení	označení rostliny	předběžné hodnocení	molekulární vyhodnocení
243	AI	AI	326	AI	AI
244	AI	AK	330	AI	AI
247	AI	AK	332	AI	AI
248	AI	AI	334	AI - AK	AI
249	AI	AI	338	AI - AK	AI
250	AI - AK	AK	339	AI	AI
252	AI	AI	340	AI	AK
254	AI - AK	AI	384	AI	AK
255	AI	AI	387	AI	AK
256	AI	AI	388	AI	AI
258	AI	AK	391	AI	AI
259	AI	AI	392	AI	AI
260	AK ?	AK	394	AI	AI
261	AI	AI	395	AI	AI
262	AI	AI	396	AI	AI
268	AI	AI	399	AI	AI
269	AI - AK	AI	400	AI	AI
273	AI	AI	402	AI	AI
274	AI	AI	404	AI - AK	AI
275	AI	AI	405	AI	AI
276	AI	AI	407	AI	AI
290	AK ?	AI	408	AI - AK	AK
292	AI	AI	409	AI - AK	AI
294	AI - AK	AI	416	AI	AI
295	AI - AK	AI	419	AI	AI
299	AI	AI	420	AI	AI
300	AI	AI	421	AI	AK
301	AI - AK	AI	422	AI	AI
303	AK ?	AI	423	AI	AK
304	AI	AI	425	AI	AI
305	AI	AK	426	AI	AK
308	AI	AI	427	AI	AI
309	AI	AK	430	AI	AI
310	AI	AI	431	AI	AK
311	AI - AK	AK	432	AI	AI
312	AI	AK	433	AI	AK
313	AI	AI	434	AI	AI
314	AI	AI	435	AI	AI
315	AI	AK	437	AI	AI
318	AI - AK	AI	438	AI - AK	AI
320	AI	AK	439	AI - AK	AI
322	AI - AK	AK	441	AI	AI
324	AI - AK	AI	443	AI	AI
325	AI	AK	444	AI	AI

Příloha 2 (pokračování) Tabulka porovnání předběžného fenotypového určení s molekulárním vyhodnocením

označení rostliny	předběžné hodnocení	molekulární vyhodnocení	označení rostliny	předběžné hodnocení	molekulární vyhodnocení
445	AI	AI	512	AI - AK	AI
446	AI	AK	513	AI	AK
447	AI	AK	515	AI - AK	AI
448	AI	AK	517	AI	AK
452	AI	AK	518	AI - AK	AI
453	AI - AK	AI	520	AI	AI
454	AI	AK	524	AI	AK
455	AI	AI	525	AI	AI
456	AI	AI	527	AI	AI
457	AI	AK	529	AI	AK
458	AI	AK	530	AI	AK
459	AI	AI	533	AI	AK
461	AI	AI	536	AI	AI
462	AI	AI	537	AI	AK
463	AI	AI	538	AI	AI
464	AI	AI	543	AI	AI
465	AI	AI	544	AI - AK	AK
466	AI	AI	545	AI	AK
467	AI	AK	546	AI	AI
468	AI	AK	550	AI	AI
470	AI	AI	551	AI	AK
471	AI	AI	552	AI	AI
472	AI	AI	553	AI - AK	AI
473	AI	AI	554	AI	AI
474	AI	AI	555	AI	AI
475	AI	AI	558	AI	AI
476	AI	AK	559	AI	AI
477	AI	AI	561	AI	AI
480	AI	AK	564	AI	AI
482	AI	AK	567	AI	AI
485	AI	AI	570	AI	AI
486	AI	AI	571	AI	AI
487	AI	AI	572	AI	AI
492	AI	AK	574	AI - AK	AI
493	AI	AI	592	AI	AI
495	AI	AI	593	AI	AI
496	AI - AK	AK	595	AI	AI
499	AI	AI	596	AI	AI
503	AI	AI	597	AI	AI
504	AI	AK	599	AI	AI
505	AI	AI	601	AI	AK
507	AI	AI	603	AI	AI
509	AI	AI	604	AI	AK
510	AI - AK	AI	606	AI - AK	AI

Příloha 3 primerové páry SLGa, SLGb a SLGc

