

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Rostlinné biotechnologie  
Katedra: Rostlinné výroby a agroekologie  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Využití molekulárních markerů ve  
šlechtitelských programech řepky

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.  
Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor: Bc. Helena Kristinová

České Budějovice, duben 2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Helena KRISTINOVÁ**  
Osobní číslo: **Z11680**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**  
Název tématu: **Využití molekulárních markerů ve šlechtitelských programech řepky**  
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

**Úvod:** Stručný nástin významu tématu a cíl práce.

Cílem práce bude optimalizace metod PCR analýzy a vývoj markerů pro selekci cílových rostlin v programech hybridního šlechtění řepky.

**Literární přehled:** Význam řepky, moderní trendy ve šlechtění řepky, využití CMS a AI v programech šlechtění hybridních odrůd, zhodnocení významu molekulárních markerů ve šlechtění rostlin.

**Materiál a metody:** Popis analyzovaných šlechtitelských materiálů, popis metodiky analýzy molekulárních markerů a hodnocení dat.

**Výsledky:** Vyhodnocení výsledků PCR analýzy, vyhodnocení primárních elektroforetických dat, uspořádání do tabulek a grafů, databáze spekter.

**Diskuse:** Porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

**Závěr:** Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky.

**Seznam použité literatury:** V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

**Obsah:** Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Powell, W.; Morgante, M.; Andre, Ch.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingey, S.; Rafalski, A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, Molecular Breeding, Kluwer Academic Publishers.

Koprna, R. (2007): šlechtění řepky na kvalitu, Seminář šlechtitelů, MZLU Brno. Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley & Sons, Inc., New York.

Avise J.C. (2004): Molecular Markers, Natural History, and Evolution. - Sinauer Associates, London.

Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. - CRC Press, Boca Raton, USA.

Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.**

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Konzultant diplomové práce:

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: 26. března 2013

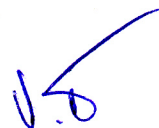
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2013



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13 ④  
370 05 České Budějovice

L.S.



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 26. března 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma „Využití molekulárních markerů ve šlechtitelských programech řepky“ jsem vypracovala 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 2013

.....  
Bc. Helena Kristinová

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce, Ing. Lence Havlíčkové, Ph.D. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, velkou podporu a pomoc při vypracování diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za velkou podporu při průběhu celého studia.

Bc. Helena Kristinová

## **ANOTACE:**

Ve snaze zvýšit produkci je šlechtění zaměřeno na linie využitelné pro tvorbu  $F_1$  hybridů. Samčí sterilita a autoinkompatibilita by zde pak mohla najít významné uplatnění. Velké naděje jsou v posledních letech vkládány do tzv. molekulárních metod, tedy postupů, které v našem případě využívají molekulárně-genetických technik, které jsou rychlejší, spolehlivější a hlavně specifitější než klasické postupy založené na morfologických deskriptorech. Cílem diplomové práce byla optimalizace metod PCR analýzy a vývoj markerů pro selekci cílových rostlin v programech hybridního šlechtění řepky.

V diplomové práci byl testován nový marker detekující gen obnovy fertility (*Rf*) u rostlinného materiálu CMS *Ogu*-INRA. Primerový pár RsPPRF2/RsPPRR2 byl vytvořen v kódující oblasti pro PPR-B protein, který se podílí na obnově fertility u CMS *Ogu*-INRA. Navržené primery BrSLGIIF/BrSLGIIR se testovaly u AI rostlin. Nejoptimálnější teplota nasedání testovaných primerů BrSLGIIF/BrSLGIIR byla z testovaného rozmezí 58 °C. Přesto docházelo k amplifikaci i u AK rostlin. U nově navržených primerů byla provedena optimalizace podmínek PCR reakce. S použitím dostupných primerů e/f byl technikou PCR-RFLP testován soubor  $F_1$  hybridů vzniklých po křížení AI linií s odlišnými *S* II haplotypy, za účelem detekce možného polymorfismu.

**Klíčová slova:** *Brassica napus*, molekulární markery, PCR, CMS, AI

## **ANOTATION:**

Current breeding of oilseed rape is focused on breeding of F<sub>1</sub> hybrids and the male sterility and self-incompatibility could play the significant role in hybrid breeding programmes. Plant breeders also more widely utilize molecular genetic techniques for selection of desirable plants/genotypes. Molecular methods are faster, more reliable and more specific than conventional ones, which are based mainly on morphological descriptors. The aim of my thesis was to optimize PCR analysis methods and to develop specific molecular markers for target plant selection in oilseed rape hybrid breeding programmes.

The new marker for detection of fertility restoration gene (*Rf*) in CMS *Ogu*-INRA plants was tested. New primer pair RsPPRF2/RsPPRR2 was designed in the coding region of PPR-B protein, which participates in the restoration of fertility in CMS *Ogu*-INRA. Also newly designed primers BrSLGIIF/BrSLGIIR were tested in SI plants. The optimal annealing temperature of these primers was 58 °C. But amplification in some SC plants was also observed. The optimization of the PCR reaction was performed for all designed primers. The set of F<sub>1</sub> SI hybrids created by crossing of two lines with different *S* II haplotypes was tested by using of the PCR-RFLP technique for detection of polymorphism in amplified fragments.

**Key words:** *Brassica napus*, Molecular markers, PCR, CMS, SI

## **OBSAH:**

1 ÚVOD	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Popis <i>Brassica napus</i>	9
2.2 Pěstování <i>Brassica napus</i> v ČR	13
2.3 Hybridní šlechtění <i>Brassica napus</i>	15
2.3.1 <i>Autoinkompatibilita a cytoplazmatická samčí sterilita</i>	17
2.4 Molekulární markery	19
2.4.1 <i>Techniky založené na polymerázové reakci</i>	21
2.4.2 <i>Techniky založené na hybridizaci</i>	21
2.4.3 <i>Sekvenování</i>	27
3 PRAKTICKÁ ČÁST	29
3.1 Materiál	29
3.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)	35
3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	36
4 VÝSLEDKY	39
5 DISKUZE	44
6 ZÁVĚR	48
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49



# 1 ÚVOD

Od marketingového roku 2007/08 dosahuje produkce řepky olejné v České republice více než 1 mil. t. na osevní ploše více než 300 tis. ha. V letošní sezóně se odhaduje, že řepka byla v České republice zaseta na 420–430 tis. ha. Důvodem navýšení produkce řepky je zvýšení sklizňových ploch i dosahování dobrých hektarových výnosů. Veškeré sklizené řepkové semeno nachází uplatnění na domácích i zahraničních trzích. Řepka olejná představuje v České republice pro pěstitele jednou z rentabilních komodit (MZE, 2009).

V hybridním šlechtění řepky olejné (*Brassica napus* L. conv. *napus*) se využívá heterozního efektu ve formě nárůstu výnosu semene, výnosu oleje, výšky rostlin, vitality a jistoty přezimování. Naopak na znaky jako obsah olejnatosti, hmotnost tisíce semen, odolnost proti poléhání, rezistenci k herbicidům (Kwon *et al.*, 2001) a obsah glukosinolátů heteroze vliv nemá (Koprna *et al.*, 2012). Ve snaze zvýšit produkci je šlechtění zaměřeno na linie využitelné pro tvorbu F<sub>1</sub> hybridů. Využití genetických systémů umožňujících tvorbu F<sub>1</sub> hybridů je ve šlechtitelské práci velmi žádané. Samčí sterilita a autoinkompatibilita by zde pak mohla najít významné uplatnění (Žaludová *et al.*, 2012).

Šlechtění rostlin si klade za cíl vytvářet odrůdy vhodné pro pěstování k různým účelům a v rozdílných přírodních podmínkách. Aby bylo dosaženo tohoto cíle, je nezbytné jednotlivé genové zdroje využitelné ve šlechtění detailně charakterizovat (Zoufalová *et al.*, 2009). Velké naděje jsou v posledních letech vkládány do tzv. molekulárních metod, tedy postupů, které v našem případě využívají molekulárně-genetických technik, které jsou rychlejší, spolehlivější a hlavně specifitější než klasické postupy založené na morfologických deskriptorech (Blažková *et al.*, 2010).

Cílem diplomové práce byla optimalizace metod PCR analýzy a vývoj markerů pro selekci cílových rostlin v programech hybridního šlechtění řepky.

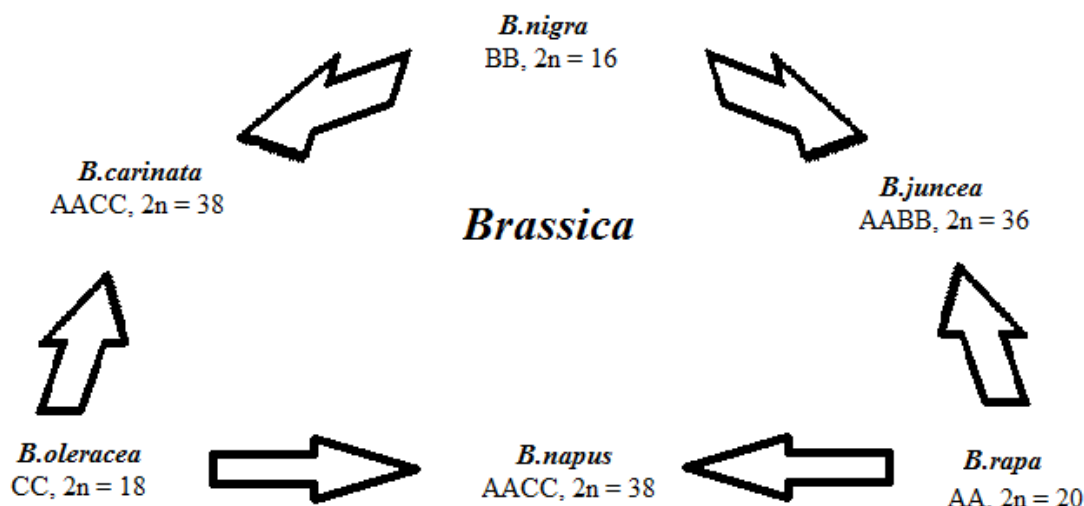
## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Popis *Brassica napus*

Řepka olejná (*Brassica napus* L. var. *napus*) je řazena do rodu brukev (*Brassica*) a spolu s dalšími asi 170 rody a 2000 druhy do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*, Diepenbrock *et al.* 1999). *Brassica napus* (AACC,  $2n = 38$ ) je relativně mladý allopolyploidní druh, který vznikl opakovaným mezidruhovým křížením a zdvojením genomů rodičovských druhů (Smýkalová *et al.* 2006; Nicolas *et al.* 2012). Předky řepky jsou *Brassica oleracea* (CC,  $2n = 18$ ) a *Brassica rapa* (AA,  $2n=20$ ; Nicolas *et al.* 2012).

V rámci rodu *Brassica* nalézáme tři diploidní druhy – *Brassica rapa* (AA,  $2n = 20$ ), *Brassica nigra* (BB,  $2n = 18$ ), *Brassica oleracea* (CC,  $2n = 18$ ) a tři přirozené spontánní amfidiploidi – *Brassica napus* (AACC,  $2n = 38$ ), *Brassica juncea* (AACC,  $2n = 38$ ), *Brassica carinata* (AABB,  $2n = 34$ ). Mnoho studií ukázalo, že zmíněné tři amfidiploidní druhy *Brassica* pochází z mezidruhového křížení mezi třemi diploidními druhy (obr. č. 1; Maoteng *et al.*, 2010).

Obr. č. 1 Vztah mezi rodem *Brassica* (převzato a upraveno: Maoteng *et al.*, 2010)



Řepka olejná je poměrně mladá olejnína mírného pásma (Bečka *et al.*, 2007). Ozimá řepka má v našich podmínkách vegetační dobu 300 až 340 dnů. Řepka vytváří mohutný křovitý kořen. U ozimé řepky se v podzimním období vytvoří listová růžice (fáze vegetativní) a na jaře se stonek prodlužuje a zakládá se květenství (fáze generativní). Kvetení porostu zpravidla trvá 20 - 25 dnů a většinou celé probíhá v květnu. Obvykle žlutý květ je stavěn podle čísla 4. Dvouřadá šesule zpravidla obsahuje 15 - 20 semen s hmotností tisíce semen 4,5 až 5,5 g. Semena jsou zpravidla tmavě fialovohnědá až šedočerná a lesklá. Řepka ozimá je typickou dlouhodobou rostlinou, pro jejíž jarovizaci je vhodnější krátký den. Řepka je rostlinou včelomilnou (Agritec, 2012), je fakultativně cizosprašná, ovšem samosprašnost u moderních odrůd zcela převažuje (Žaludová *et al.*, 2012).

Řepka vyniká vysokou plasticitou, díky které prošla za posledních třicet let výraznou kvalitativní změnou. První, nejvýznamnější, byla přeměna řepky olejné z technické plodiny na plodinu, která se stala jednou nejvýznamnějších surovin potravinářského průmyslu (Bečka *et al.*, 2007). Značný posun ve snížení obsahu nežádoucích glukosinolátů (GSL) v pokrutinách a kyseliny erukové (KE) v oleji je toho jasným důkazem (tab. č. 1, Prugar *et al.*, 2008). Intenzivním šlechtěním došlo k výrazné změně v obsahu a složení masných kyselin dle individuálních požadavků zpracovatelů (Bečka *et al.*, 2007).

**Tab. č. 1 Šlechtitelský pokrok a jeho vliv na využití a pěstování řepky olejné v ČR za posledních 30 let (dle Prugar et al., 2008).**

<b>Období (přibližně)</b>	<b>Charakteristika odrůd</b>	<b>Využití</b>
do r. 1975	EG typ odrůd s nevyhovující potravinářskou a krmnou kvalitou – vysoký obsah KE (cca 50 %) v oleji a GSL ve šrotu (nad 80 $\mu\text{mol/g}$ semene)	malé možnosti potravinářského využití; olej hlavně pro technické účely; nízké osevní plochy
r. 1975 až 1985	0 typ odrůd se sníženým obsahem KE (do 5 %), ale nesníženým vysokým obsahem GSL	potravinářské využití; prakticky bez krmivářského uplatnění; zvýšení osevních ploch
r. 1985 až současnost	00 typ odrůd s minimálním obsahem KE a nízkým obsahem GSL (od r. 2005 do 18 $\mu\text{mol/g}$ semene v osivu při registraci odrůd)	bezproblémové potravinářské využití; přidávání šrotů a výlisků do krmných směsí; zvýšení osevních ploch
od r. 1995	Rozšíření hybridních odrůd (nejdříve na bázi systému MSL Lembke, později Ogu-INRA)	stejně využití jako 00 odrůdy; uplatnění heterozního efektu v podobě vyšších výnosů; obecně lepší odolnost rostlin proti stresorům; zvýšený obsah GSL u prvních Ogu-INRA hybridů
od r. 2000	Výkonné liniové odrůdy s velmi nízkým obsahem GSL, nové trendy – změněná skladba mastných kyselin v oleji, žlutosemenné odrůdy, trpasličí odrůdy, využití GMO technologií atd.	nárůst osevních ploch; šlechtění odrůd se speciálním složením olejů; potravinářské účely; MEŘO pro výrobu bionafty; tolerance k herbicidům; mrazuvzdornost, odolnost k chorobám a škůdcům atd.

Kvalita řepkového oleje je posuzována podle procentuálního podílu jednotlivých mastných kyselin. U dvounulových odrůd je dominantní kyselina olejová C18:1. Celkově je vhodnost řepkového oleje pro potravinářské využití dána nízkým obsahem nasycených mastných kyselin (kyselina palmitová, stearová, arachová a behenová), vysokým obsahem mononenasyčené kyseliny olejové a příznivým poměrem i obsahem esenciálních kyselin linolenové a linolové (v poměru 2:1). Řepkový olej má i poměrně vysoký obsah tokoferolů od 378 do 800  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Obsah kyseliny erukové způsobující špatnou resorpci při trávení, retardaci růstu a kardiální lipidózu byl díky šlechtitelskému pokroku prakticky snížen na téměř

nulovou hodnotu. Opačným směrem šlechtění lze dosáhnout zvýšení obsahu kyseliny erukové na 50-60 % (odrůda Oáza, Erox). Jedná se o tzv. „E0“ typ řepky, jejíž olej je určen pro výrobu maziv, detergentů a další speciální účely. Využití a pěstování E0 typů řepky je však závislé na zájmu ze strany zpracovatelů. Odrůdy pěstované u nás jsou výhradně „00“ typu, tj. s nízkým obsahem glukosinolátů ve šrotu a kyseliny erukové v oleji. Odrůdy registrované a doporučené v České republice mají zatím standardní zastoupení mastných kyselin v oleji a výrazně se neliší ani dalšími kvalitativními parametry, kromě obsahu glukosinolátů, kde je patrná výraznější variabilita. Ve světě je však již v praxi rozšířeno několik odrůd se změněnou skladbou mastných kyselin v oleji, které byly vyšlechtěny konvenčními postupy i genovými modifikacemi viz. obr. č. 2. V případě *Ogu*-INRA hybridů není kvalita oleje limitujícím faktorem při jejich šlechtění. Hlavním nedostatkem je kromě vysokého obsahu GSL nižší obsah oleje u prvních restaurovaných hybridů, který je dán rovněž nízkým obsahem oleje u použitých linií obnovitelů fertility (Koprna, 2008).

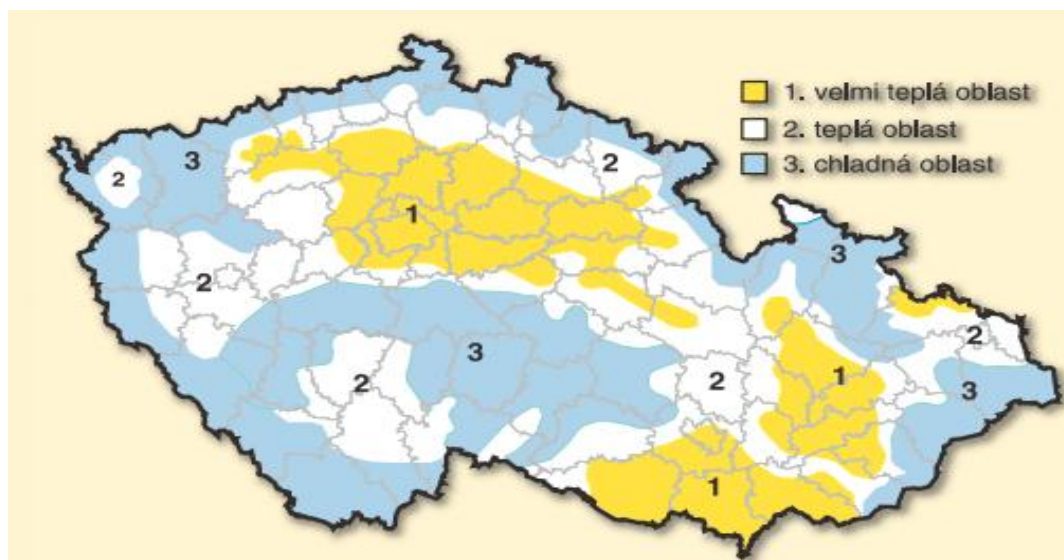
**Obr. č. 2 Možné modifikace obsahu mastných kyselin v oleji a jejich předpokládané využití (Koprna, 2007).**

typ modifikace obsahu mastných kyselin	Využití
nízký obsah k. linolenové (HOLL řepka)	vyšší oxidační stabilita oleje
vysoký obsah k. kaprylové a kaprové	intravenózní energetické výživa
vysoký obsah k. laurové (nad 40 %)	výroba cukrovinek
vysoký obsah k. palmitové	margarin, pokrmový tuk a cukrovinky
vysoký obsah k. stearové (nad 30 %)	margarin, pokrmový tuk a cukrovinky
nízký obsah k. palmitové	salátové oleje
nízký obsah k. stearové	salátové oleje
vysoký obsah k. palmitové a stearové	margarin a cukrovinky
vysoký obsah k. olejové nad 80 %	zvýšená stabilita při tepelném namáhání
vysoký obsah k. myristové a palmitové	náhražky másla
vysoký obsah k. petroselinové	polymery, detergenty
vysoký obsah k. ricinoolejové	mazadla, změkčovadla, kosmetika

## 2.2 Pěstování *Brassica napus* v ČR

Začátkem devadesátých let minulého století došlo poměrně výraznému propadu pěstování řepky, a to do značné míry v důsledku restrukturalizace našeho zemědělství. Od roku 1993 následoval víceméně kontinuální růst výnosů. K přerušení růstu výnosu však došlo poškozením porostů v důsledku špatného přezimování (1996 a 2003), resp. nebývalým výskytem houbových chorob a bejlmorky kapustové (2002). Sklizeň řepky od roku 2004 patří výnosově mezi velmi dobré; mimořádně úspěšný byl rok 2004, jenž se stal díky prakticky ideálnímu průběhu počasí se značným odstupem od ostatních let rokem rekordním. Řepka se v České republice pěstuje na provozních plochách již více než deset let, a to od roku 1998. Počáteční výrazné zvyšování ploch bylo vystřídáno mnohem mírnějším tempem růstu mezi roky 2002/03 a 2007/08 (Baranyk, 2012).

*Obr. č. 3 Mapa pěstitelských oblastí v České republice (Baranyk, 2012).*

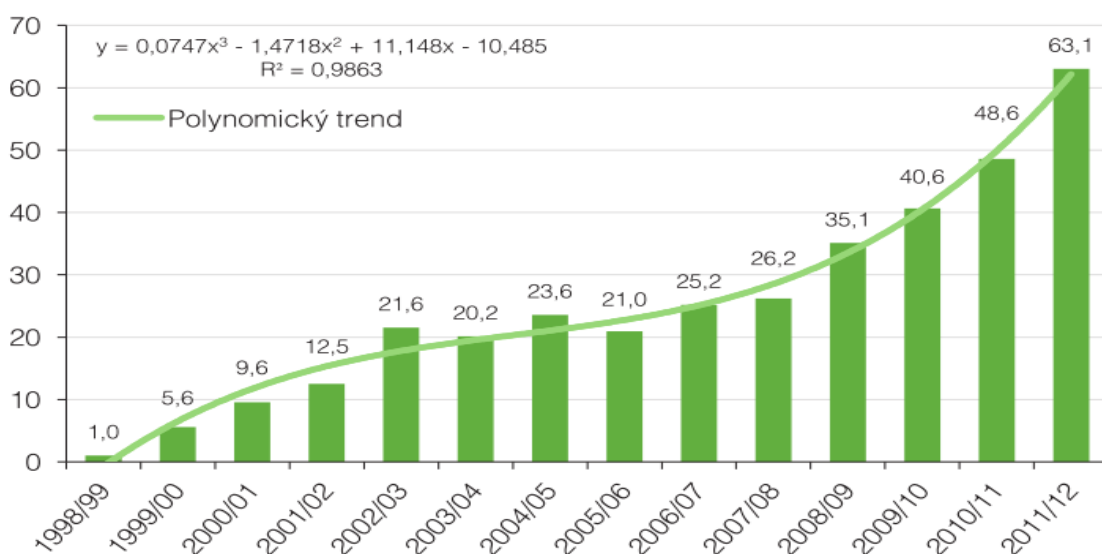


V posledních letech jsou však přírůstky podílu hybridních odrůd na celkových plochách řepky opět významné a pro sklizeň 2010 byla poprvé překročena hranice 40 % (Baranyk, 2012). V roce 2011/12 se v České republice pěstovalo neuvěřitelných více než 50 různých hybridních odrůd řepky ozimé (obr. č. 4). Jejich výměra a s tím související význam se pohybuje od několika hektarů až po desetitisíce hektarů, celkem se však jedná o cca 63 % celkové osevní plochy řepky založené

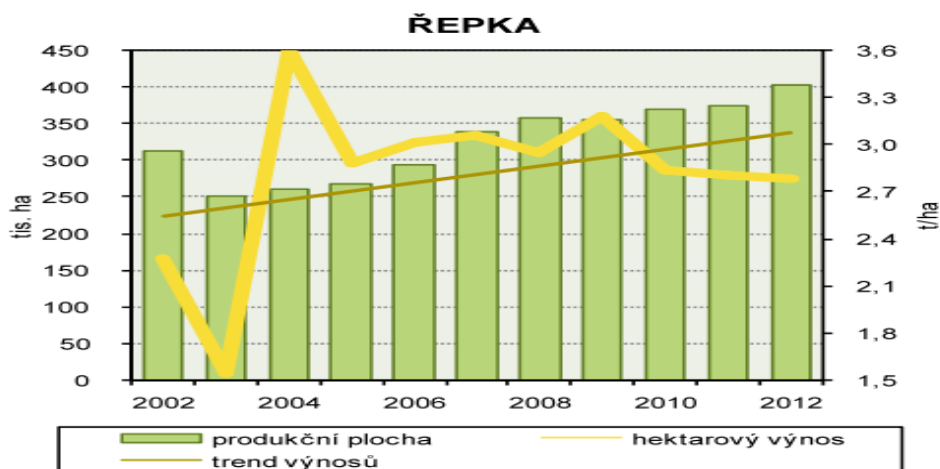
certifikovaným osivem, což nejlépe dokládá rostoucí oblibu těchto odrůd mezi našimi pěstiteli (Agrotip, 2012).

Plocha řepky (2012) vzrostla o 28 tis. ha (o 7,5 %) na 401 tis. ha (obr. č. 5) a poprvé v historii přesáhla čtyřistatisícovou hranici. Proti roku 2002 došlo k nárůstu o 88 tis. ha (Český statistický úřad, 2012). V letošní sezóně se odhaduje, že řepka byla v České republice zasetá na 420–430 tis. ha. V současnosti zaujímají hybridy na českých polích více než dvě třetiny z osetých ploch.

**Obr. č. 4 Podíl hybridních odrůd řepky ozimé v ČR od roku 1998 (Agrotip, 2012).**



**Obr. č. 5 Produkční výnos a hektarový výnos řepky (Český statistický úřad, 2012)**



## 2.3 Hybridní šlechtění *Brassica napus*

V hybridních šlechtitelských programech je nezbytné zajistit efektivní systém kontroly při opylování, který zabrání samosprašení v rámci jedné rostliny, nebo na úrovni mateřské rodičovské linie. Při použití samosprašných rostlin v hybridním šlechtění jsou využívány různé přístupy a systémy zabráňující samosprašení na úrovni mateřských rostlin (Havlíčková *et al.*, 2013). Ve snaze zvýšit produkci je šlechtění zaměřeno na produkci linií využitelných pro tvorbu F<sub>1</sub> hybridů (Žaludová *et al.*, 2012).

Jednotlivé kvantitativní a kvalitativní směry šlechtění u řepky lze rozdělit na:

1. kvantitativní charakteristiky (Agritec, 2012)
  - výnos nad 4 t/ha semen
  - zimovzdornost
  - zdravotní stav – odolnost proti chorobám, fomové černání stonku (*Phoma lingam*), hlízenka obecná (*Sclerotinia sclerotiorum*)
2. zlepšení kvality oleje (tab. č.2, Koprna, 2007)
  - zvýšení obsahu oleje v semeni
  - změna zastoupení jednotlivých mastných kyselin v oleji (snížení obsahu kys. linolenové)
  - zvýšení obsahu jednotlivých a celkových tokoferolů (reps. jiných antioxidantů)
  - zvýšení obsahu jednotlivých a celkových fytoosterolů a lecitinu
3. zlepšení kvality šrotu (Koprna, 2007)
  - snížení obsahu antinutričních látek ve šrotech (glukosinoláty, fytin, tanin, sinapin, vláknina)
  - zvýšení obsahu proteinů a jednotlivých aminokyselin ve šrotech



**Tab. č. 2: Hlavní parametry kvality u současných odrůd a jejich variační rozpětí. Šlechtitelské cíle se mění také v závislosti na požadavcích zpracovatelů a aktuální situaci v poptávce po surovinách (Koprna, 2007).**

Znak	Rozmezí	Šlechtitelský cíl
Obsah oleje (% v sušině)	<b>46,29 – 49,63</b>	50 %
- % kyseliny olejové	<b>60,70-67,25</b>	80 %
- % kyseliny linolové	<b>16,10 – 21,70</b>	20, resp. 30 – 40 %*
- % kyseliny linolenové	<b>7,89 – 10,36</b>	2 – 3 %
- % kyseliny erukové	<b>0,04 – 0,42</b>	není problém
Obsah glukosinolátů (GSL) ( $\mu\text{mol/g}$ sem. při 9% vlhkosti a 46% olejnatosti)	<b>5,36 – 19,41 (liniové odr.)</b> <b>9,02 – 22,73 (hybridní odr.)</b>	pod 5 $\mu\text{mol/g}$

\* Obsah jednotlivých mastných kyselin odpovídá specifickým šlechtitelským cílům.

Vývoj odrůdové skladby v České republice zaznamenal v posledních letech značné změny. Dříve obvyklá situace, kdy tři hlavní odrůdy dosahovaly 50-75% podílu na trhu, se stala minulostí, a z dnešního pohledu je až nepochopitelná. Starší odrůdy jsou stále výrazněji nahrazovány jejich novějšími a výkonnějšími nástupci. Zřejmý je také posun k diverzifikaci odrůdové skladby, která se stává stále pestřejší. (Baranyk, 2012).

### 2.3.1 *Autoinkompatibilita a cytoplazmatická samčí sterilita*

Pro každý fungující hybridní systém je nezbytnou podmínkou jeho použití existence samčí sterility, která je stabilní v různých environmentálních podmínkách ale také systému obnovitele fertility (restorera), který zabezpečí v F<sub>1</sub> generaci dokonalejší opylení rostlin, než v případě směsi sterilní hybrid + opylovač (Koprna, 2007).

#### **Autoinkompatibilita**

Pod pojmem autoinkompatibilita se rozumí neschopnost rostlin vytvářet semena při opylení vlastním pylem, který nese gamety stejného genetického založení. Při AI se na rozdíl od sterility zachovává funkčnost samčího a samičího gametofytu (Sáková *et al.*, 1999). Autoinkompatibility (AI) lze u řepky olejky úspěšně využít k produkci F<sub>1</sub> hybridů (Havlíčková *et al.*, 2013). AI je rozšířený mechanismus zabraňující samosprašení používaný kvetoucími rostlinami k předcházení inbrední deprese a pomáhá vytvořit a udržet genetickou diverzitu uvnitř druhu (Žaludová *et al.*, 2012).

U řepky je specifická interakce mezi pylem a bliznou kontrolována na sporofytické úrovni a to působením (minimálně) dvou genů a jejich alelických forem (*S* haplotypů) přítomných v jednom mendelistickém lokusu, nazývaném též *S* lokus (Bateman, 1955; Nasrallah *et al.*, 1991). Studium genů *S* lokusu vedlo k identifikaci samčího a samičího determinantu, kteří se podílejí na AI reakci; konkrétně jde o peptidový ligand (*S* locus protein 11; *SP11*, nebo také *S* locus cistein-rich protein; *SCR*; Schopfer *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999) a odpovídající receptor (*S*-locus receptor kinase; *SRK*; Stein *et al.*, 1991). Specifická rozpoznávací reakce je zajištěna vzájemnou interakcí mezi samčím determinantem *SRK* a jeho ligandem; samičím determinantem *SP11*. Interakce mezi *SP11* a *SRK* spouští signální kaskádu s ohledem na přítomné *S* haplotypy, která plyne v odmítnutí vlastního pylu. Přesná signální dráha včetně přítomnosti její regulace je stále nejasná (Zhang *et al.*, 2011). *S* haplotypy jsou členěny do dvou tříd: třída I je obecně dominantní nad třídou II v pylu a kodominantní v blizně a způsobuje silný AI fenotyp (Nasrallah *et al.*,

1993). Většina kultivovaných odrůd je však autokompatibilních (AK; Zhang *et al.*, 2011) a obsahuje ve svém A genomu *S* haplotyp třídy I (podobný haplotypu  $S^{47}$  z *B. rapa*) a ve svém C genomu *S* haplotyp třídy II (podobný haplotypu  $S^{15}$  z *B. oleracea*; Okomot *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). AK je u řepky olejky způsobena přítomností nezávislé mutace v dominantním *S* haplotypu, která způsobuje potlačení funkčního recesivního *S* haplotypu (Okomot *et al.*, 2007). Na molekulární úrovni byly dosud identifikovány čtyři odlišné *S* haplotypy třídy II u *Brassica rapa* ( $S^{29}$ ,  $S^{40}$ ,  $S^{44}$ ,  $S^{60}$ ) a tři u *B. oleracea* ( $S^2$ ,  $S^5$ ,  $S^{15}$ ; Soto *et al.*, 2006; Shiba *et al.*, 2002).

### **Cytoplazmatická samčí sterilita**

Cytoplazmatická sterilita může být podmíněna jadernými geny, cytoplazmatickými geny nebo interakcí jaderných a cytoplazmatických genů. V praxi se nejvíce využívá cytoplazmatická samčí sterilita (CMS; Sáková *et al.*, 1999). Systém cytoplazmatické samčí sterility vznikl fúzí protoplastů z ředkve japonské odrůdy do řepky ozimé (Koprna *et al.*, 2012) mezi nimiž byl hybrid nesoucí tzv. *Ogu*-INRA CMS, který vede k úplné interupci pylu a tím i vývoji prašníků s normální morfologií. Jedná se o mateřsky dědičný mitochondriální genom, který indukuje pylovou sterilitu (nepřítomnost životaschopného pylu). Mendelistický gen pro obnovu fertility se nazývá *Rf* a umožňuje produkci pylu v přítomnosti sterility indukující cytoplasmy. CMS se široce používá ve šlechtění rostlin, je charakteristická sníženou potřebou ruční práce při křížení a je vhodná zejména u rostlin, kde je ruční kastrace obtížná nebo nemožná a umožňuje tak rozsáhlou výrobu hybridního osiva (González-Melendi *et al.*, 2008).

Hybridní systém *Ogu*-INRA je příkladem cytoplazmaticko-genové sterility, při kterém je výsledný genotyp závislý nejen od sterilního plazmotypu *S*, ale také od přítomnosti genů obnovy fertility *Rf* v jádru. Úplný obnovitel fertility je dominantní homozygot (*RfRf*) a tak po nakřížení pylově sterilní linie s linií obnovitele fertility vznikne heterozygot *Rfrf*, který je pylově fertilní. V případě obnovitele fertility dochází k interakci mezi geny obnovy fertility *RfRf* a sterilní cytoplazmou (*S*). V takovém případě je  $F_1$  generace fertilní (*S*)*Rfrf*. Pokud dojde k opylení sterilní linie heterozygotním obnovitelem fertility *Rfrf* výsledkem je generace  $F_1$ , která je z 50 %

fertilní (S)*Rfrf* a z 50 % sterilní (S)*rfrf*. Alelický pár v jádru F<sub>1</sub> restaurovaného hybrida je tedy heterozygotní (S)*Rfrf*. Udržovatelem sterility je jakákoliv pěstovaná linie řepky, která po opylení sterilního komponentu má v generaci F<sub>1</sub> vždy sterilní cytoplazmu (S) a tudíž neprodukuje pyl (Koprna, 2007).

## 2.4 Molekulární markery

Během posledních několika desetiletí se využívají molekulární markery k odhalení polymorfismu na úrovni DNA, hodnocení rozsahu genetické variability u rostlin, popisu a identifikaci genotypů rostlin (Kumar *et al.*, 2009). Molekulární markery byly široce používány k mapování zemědělsky významných genů řepky a v mnoha případech hrají důležitou roli při šlechtění a výběru (Snowdon, 2009) a na rozdíl od proteinových markerů, DNA markery lze segregovat jako samostatné geny a nejsou ovlivněny prostředím (Kumar *et al.*, 2009). Molekulární markery byly poprvé identifikovány jako krátké fragmenty nebo řetězce DNA nacházející se na určité pozici chromozomu (Poiner, 2001). DNA markery vedly k rozsáhlé databázi genetických markerů včetně allozymů, mtDNA (mitochondriální DNA), RFLP, RAPD, AFLP, mikrosatelitů SNP (single nucleotide polymorphism) a EST (Expressed sequence tags; Liu *et al.*, 2004).

Molekulární markery na úrovni DNA jsou snadno identifikovány a jejich dědičnost lze snadno sledovat. Jejich použití je založeno na přirozeně se vyskytujícím DNA polymorfismu. Molekulární markery tvoří základ pro navrhování strategií k využití na aplikované účely. Marker musí být polymorfní (Kumar *et al.*, 2009).

**Existují různé typy markerů** (Kumar *et al.*, 2009)

- 1) Morfologické
- 2) Biochemické
  - a) Allozymy (Isozymy)
- 3) DNA molekulární markery
  - a) markery na bázi restrikčního štěpení a hybridizace – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism).
  - b) DNA markery na bázi PCR
    - i) Markery využívající specifické primery: Sekvenčně označování míst (STS – Sequence-Tagger Sites) – polymorfismus v délce sekvence (SSLP – Simple Sequence Length Polymorphism), mikrosatelity (též označené STR- Short Tandem Repeats, jednoduché opakování sekvencí (SSR – Simple Sequence Repeat)), PCR-RFPL.
    - ii) Markery využívající náhodných primerů: polymorfismus náhodně amplifikované DNA (RAPD – Random Amplified Polymorphis DNA), délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR, SNP.
  - c) Sekvenování DNA

### 2.4.1 *Techniky založené na hybridizaci*

#### **RFLP - polymorfismus délky restrikčních fragmentů**

Technika RFLP byla považována za začátek úplně jiné éry v biologické vědě a ve studiu genomu (Liu *et al.*, 2004). Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restrikční enzymy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí ve specifických oblastech chromozomů (Rosypal *et al.*, 1997). Technika je založená především na využití speciální třídy restrikčních enzymů, tj. endonukleáz. Frakcionace DNA je dosaženo pomocí elektroforézy, následuje převedení DNA z gelu na membránu, kde jsou zájmové fragmenty detekovány hybridizací s radioaktivní sondou (tzv. Southern hybridizace; Kumar *et al.*, 2009). RFLP markery jsou kodominantní. Rozdíl ve velikosti fragmentů je často veliký a vyhodnocení je poměrně snadné. Hlavní nevýhodou RFLP je relativně nízká úroveň polymorfismu (Liu *et al.*, 2004).

### 2.4.2 *Techniky založené na polymerázové reakci*

#### **PCR - Polymerázová řetězová reakce**

PCR je *in vitro* technika používaná pro enzymatickou amplifikaci specifického regionu DNA (100 – 5000bp), ohraničeného párem primerů (Ovesná *et al.*, 2007). Vybrat můžeme libovolný úsek libovolné molekuly DNA za předpokladu, že známe okrajové sekvence tohoto úseku. PCR totiž proběhne jedině tehdy, když dva krátké oligonukleotidy hybridizují s molekulou DNA, každá s jedním vláknem DNA dvoušrobovice. Tyto oligonukleotidy, které fungují jako primery syntézy DNA, ohraničují úsek, který má být amplifikovaný (Brown, 2007). Specifické primery jsou navrženy tak, aby na základě znalosti sekvence genomové DNA (je dostupná ve veřejně přístupných databázích na internetu – př. NCBI) a jejího porovnání s DNA ostatních rostlin, umožňovaly amplifikovat pouze takové úseky DNA, který je pro detekovaný organismus vysoce specifický (Demnerová, 2012). K množení vybraných úseků DNA se používá enzym polymeráza (Ovesná *et al.*, 2007). Enzym DNA polymeráza je izolovaný z *Thermus aquaticus* (Brown, 2007). Detekce

nasyntetizovaného produktu (fragmentu DNA) o očekávané velikosti, spočívá v jeho obarvení barvivem, jež se váže na dvouřetězcovou molekulu DNA (např. ethidium bromid, SYBR green), následné elektroforéze v agarovém, popř. akrylamidovém gelu, a konečné vizualizaci pod UV lampou (Demnerová, 2012). Podle požadované specifity mohou být využity různé oblasti genomu. Určitou nevýhodou je i skutečnost, že řada laboratoří vyvinula vlastní specifické postupy, které však znesnadňují přenositelnost výsledků mezi laboratořemi (Hochel, 2009).

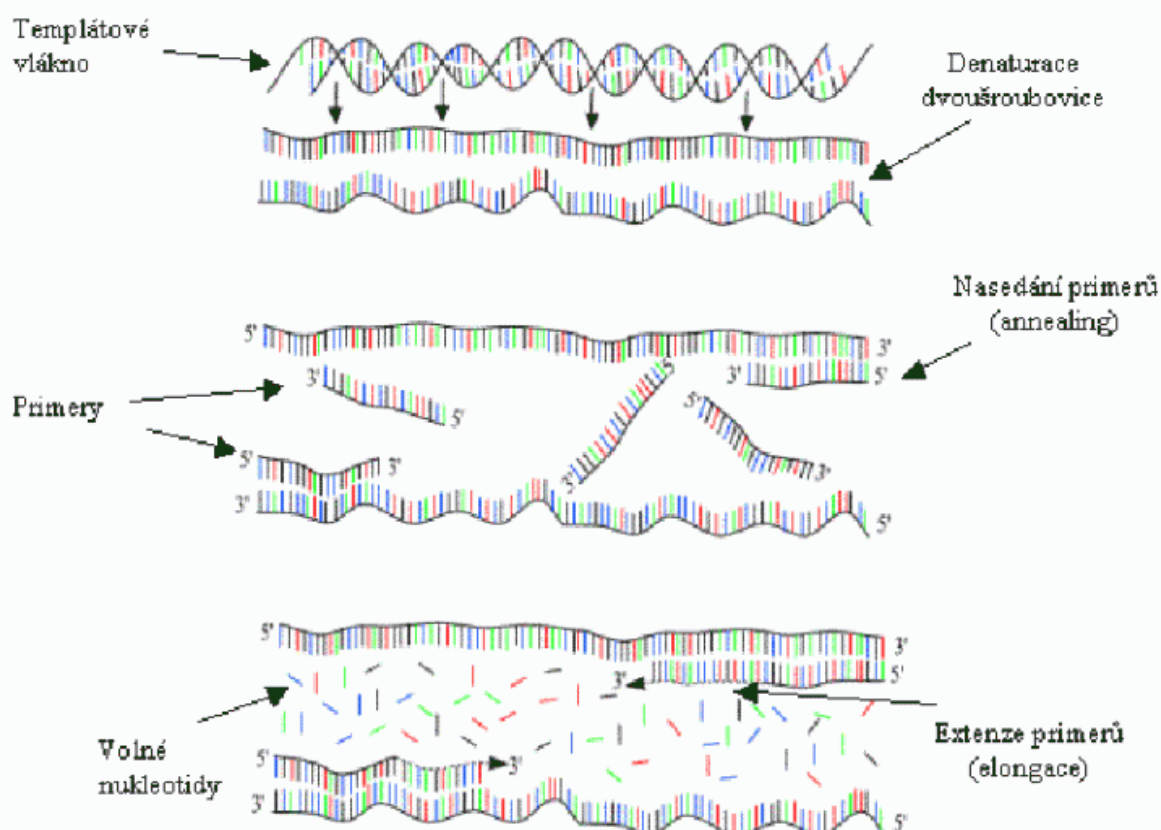
#### Reakční směs se skládá z:

- DNA (**Templát** – jednořetězcový poly(deoxy)ribonukleotid, využívaný jako zdroj informace při řízené biologické polymeraci. Při replikaci a transkripci je templátem jeden z řetězců DNA. Ten slouží jako matrice i při PCR)
- dNTPs, stavební kameny DNA (dATP = deoxyadenosin trifosfát, dGTP = deoxyguanosin trifosfát, dTTP = deoxythymidin trifosfát, dCTP = deoxycytidin trifosfát),
- dvou specifických primerů (forward a reverse) – oligonukleotidů o délce cca. 20 bází nesoucí sekvenci komplementární k části DNA (**Primer** – úsek DNA, komplementární k vybranému úseku genomu, oligonukleotid, který postačuje DNA dependentní DNA polymeráze k zahájení syntézy nového vlákna DNA kopírujícího předem zvolený úsek (gen nebo jeho část, nekódující sekvence)),
- pracovního pufru s  $MgCl^2$  ( $Mg^{2+}$  ionty slouží jako kofaktory DNA polymerázy),
- DNA polymerázy (**Taq polymeráza** – DNA dependentní DNA polymeráza izolovaná původně z termofilní bakterie *Thermophilus aquaticus*, nyní k dispozici v upravených rekombinantních verzích).

Cyklus se skládá ze třech kroků (obr. č. 6). **V prvním kroku** se templát, tj. šroubovice dvouvláknové DNA sloužící polymeráze jako vzor pro kopírování, rozdělí v zahřáté reakční směsi na dvě samostatná vlákna (denaturace 95 °C). **V druhém kroku** se reakční směs mírně ochladí v závislosti na možnostech primerů, které, začnou nasedat na vlákna DNA (annealing 50 – 60°C). **Ve třetím kroku** *Taq*

polymeráza umožní prodlužováním primerů napojených na vlákna vytvoření kopie požadované sekvence DNA (syntéza 72 °C, Ovesná *et al.*, 2007).

**Obr. č. 6 Popis cyklů PCR**



(<http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probiotickych-mikroorganismu>)

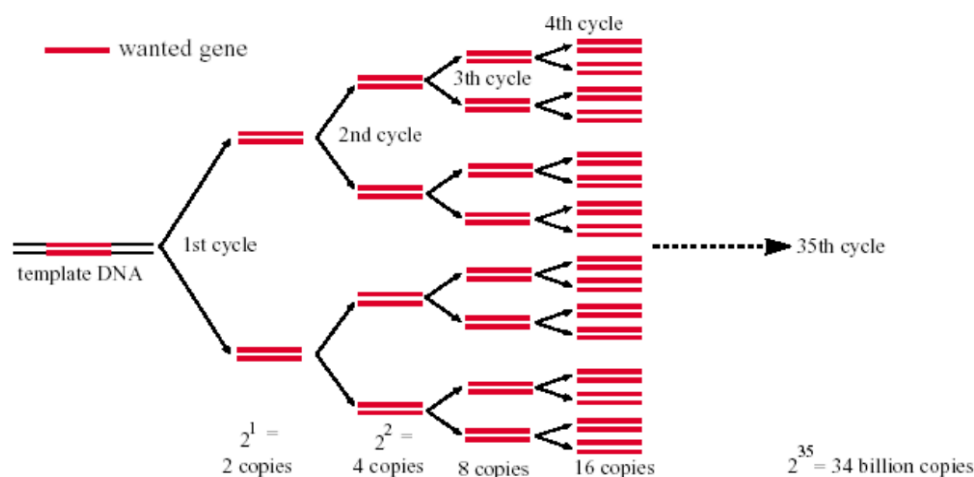
Reakce se provádí v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Pro zahájení reakce postačuje velmi malé množství výchozích molekul DNA (teoreticky stačí jediná molekula). V průběhu 20-30 cyklů (obr. č. 7) dochází exponenciálnímu nárůstu počtu úseku na DNA ohraničených místy, k nimž se připojily primery (Rosypal *et al.*, 1997). Cyklus se pak opakuje v závislosti na množství přítomné DNA a délce amplikonu. Výsledný počet kopií po amplifikaci je dán vztahem:  $c = 2^n$ , kde  $n$  je počet cyklů. Množství DNA, které se do reakční směsi vloží, tedy roste geometrickou řadou (Ovesná *et al.*, 2007). Výsledným produktem reakce jsou



fragmenty DNA definované délky (obvykle desítky až tisíce nukleotidů) analogické restriční fragmentům, jejichž přítomnost v reakční směsi se prokazuje:

- stanovení jejich velikosti elektroforézou v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu,
- Southernovou hybridizací se značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku,
- stanovení sekvence DNA.

**Obr. č. 7 Exponenciální amplifikace**



(<http://botany.natur.cuni.cz/fer/markers/Markery3-DNA,PCR,RAPD.pdf>)

**Elektroforéza** je technika používaná k separaci nukleových kyselin. K provedení je potřebná elektroforetická vana s elektrodami, gel v němž proběhne separace a zdroj stejnosměrného proudu. DNA migruje od záporného ke kladnému pólu, rychlost migrace je dána jejími vlastnostmi gelu, pufru a napětí. Fragmenty DNA, lišící se velikostí, migrují různou rychlostí, větší molekuly a molekuly se složitější strukturou jsou pomalejší (Řehout *et al.*, 2005).

### Modifikace PCR

1. zpětná neboli reverzní-PCR (RT-PCR), určená k amplifikaci molekul RNA

2. Obrácená neboli inverzní PCR (IPCR), pomocí níž lze amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničující na obou koncích DNA, jejíž sekvence je známá.
3. Asymetrická PCR, při níž je použit jeden primer.
4. In situ-PCR, umožňuje amplifikovat specifické sekvence nukleových kyselin přímo v buňkách nebo cytologických preparátech tkání a chromozomů (Rosypal *et al.*, 1997).

### **PCR-RFLP**

Tato metoda je relativně jednoduchou a dostupnou technikou, často používanou pro genotypizaci bodových mutací. V PCR se amplifikuje úsek s polymorfním místem, amplifikát se poté štěpí restriktázou, která rozpozná svou cílovou sekvenci (technika RFLP, Řehout *et al.*, 2005).

### **RAPD - polymorfismus v délce sekvence**

RAPD analýza je metoda založená na PCR technologii. Mezi její výhody patří rychlost (je použitelná pro rychlý screening a identifikaci vzorků, Čurn *et al.*, 2012), snadná detekce (Powell *et al.*, 1996) a potřeba jen velmi malého množství templátové DNA. Vzhledem k tomu, že při RAPD analýze jsou využívány náhodně generované primery, není pro její provedení vyžadována znalost cílových sekvencí a studovaného genomu. RAPD detekuje polymorfismus v celém genomu. RAPD markery byly úspěšně používány v genetickém fingerprintingu při analýze odrůd různých druhů rodu *Brassica*, dále jsou využitelné při analýze původů a genetickém mapování (Čurn *et al.*, 2012). V molekulární ekologii lze určit taxonomické identity, posoudit příbuzenské vztahy, analyzovat vzory smíšeného genomu a vytvořit konkrétní sondy. Mezi hlavní výhody RAPD patří jejich aplikovatelnost u anonymních genomů, kde je k dispozici pouze omezené množství DNA, účinnost a nízké náklady (Handryš *et al.*, 1992).



## Mikrosatelity

Mikrosatelity (MS, STR nebo SSR) jsou úseky DNA, které se skládají z mnohokrát opakující se mono-, di-, tri-, tetra- nebo penta-nukleotidových jednotek, které jsou uspořádány po celém genomu většiny eukaryotických druhů (Kumar *et al.*, 2009). Nejvýznamnějším příkladem mikrosatelitů jsou kódované regiony, které způsobují genetické choroby u člověka (CAG repetice vede k mentální retardaci). Většina mikrosatelitních lokusů jsou relativně malé (od několika do několika stovek repetice) a tím je významná u PCR (usnadňuje genotypizaci). Obecně lze říci, že mikrosatelity mají větší počet repetice a jsou více polymorfní, ačkoliv polymorfismus byl pozorován i u mikrosatelitů s pouhými pěti repeticemi (Liu *et al.*, 2004). Mikrosatelitní markery se vyvinuly z genomických knihoven a mohou přepisovat region genomu. Polymorfismus mikrosatelitů se může zjistit pomocí metody Southern hybridizace nebo PCR (Kumar *et al.*, 2009).

### 2.4.3 Sekvenování

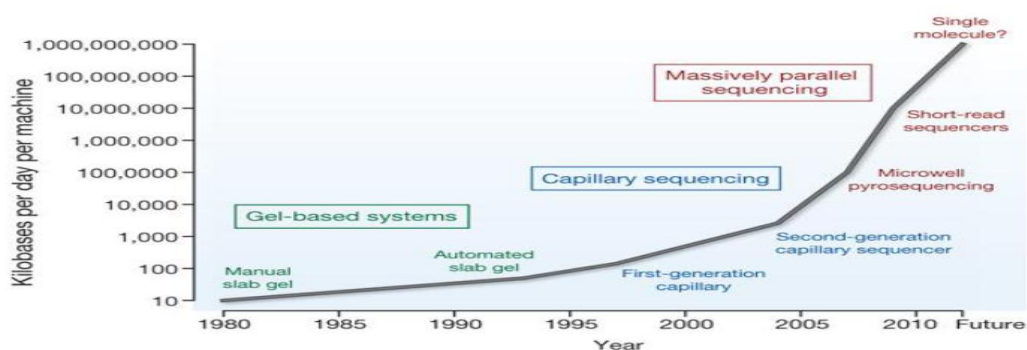
Cílem sekvenování DNA je stanovení její primární struktury. Základním požadavkem pro sekvenování je získat molekuly DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji používaným výchozím materiálem pro sekvenování DNA jsou proto restriční fragmenty, klonované do vhodného klonovacího vektoru, nebo fragmenty získané PCR (Rosypal *et al.*, 1997).

#### Metody sekvenování DNA

- 1) **Chemické sekvenování DNA (Maxamovo-gilbertovo sekvenování)** – metoda určuje sekvenci nukleotidů v molekule DNA, kde dochází k chemickému štěpení DNA v místě určitých bází (adenin, guanin, cytosin nebo thymin; Maxam *et al.*, 1977).
- 2) **Enzymatické sekvenování DNA (Sangerovo sekvenování)** – metoda je založená na řízené terminaci syntézy DNA *DNA-polymerázou* (Sanger *et al.*, 1975).

- 3) **Pyrosekvenování** - série enzymatických reakcí, během kterých se zaznamenává začlenění DNA báze do syntetizovaného řetězce díky uvolněnému viditelnému záření. Včlenění kteréhokoliv ze čtyř dNTP (dNTP se přidávají postupně) do komplementárního řetězce k templátové DNA vede k uvolnění pyrofosfátu, sloučeniny, která je dále převedená na ATP. ATP slouží v reakci spřažené s enzymem luciferázou k uvolnění protonu a ke vzniku světelného signálu. Světelný impuls uvolněný při zabudování nového nukleotidu se zaznamenává a tento cyklus se při prodlužování řetězce komplementárního k sekvenované ssDNA opakuje (Žák, 2009).
- 4) **454 sekvenování** - 454 sekvenování posouvá technologii pyrosekvenování o krok dále (souběžně probíhají stovky tisíc až více než milion sekvenačních reakcí) a umožňuje sekvenování třeba i celých genomů. Genomová DNA je mechanicky fragmentována na kratší úseky. PCR probíhá na syntetických kuličkách v olejové emulzi. Jedna molekula sekvenované ssDNA je emulzní PCR namnožena, takže na konci reakce je ke kuličce přichyceno v průměru 10 milionů identických kopií původní ss DNA. Tyto kuličky jsou vpraveny do jamek speciální optické destičky (do jedné jamky se vejde jen jedna DNA kulička), na které jsou přichyceny enzymy nezbytné pro pyrosekvenování. Naplněná optická destička se vloží do přístroje, kde dochází k vlastnímu pyrosekvenování (Žák, 2009).

**Obr. č. 9 Vývoj sekvenačních metod za posledních 30 let**



([http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii/Prednasky\\_2012/NextGenerationSequencing\\_2012.pdf](http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii/Prednasky_2012/NextGenerationSequencing_2012.pdf))

### 3 PRAKTICKÁ ČÁST

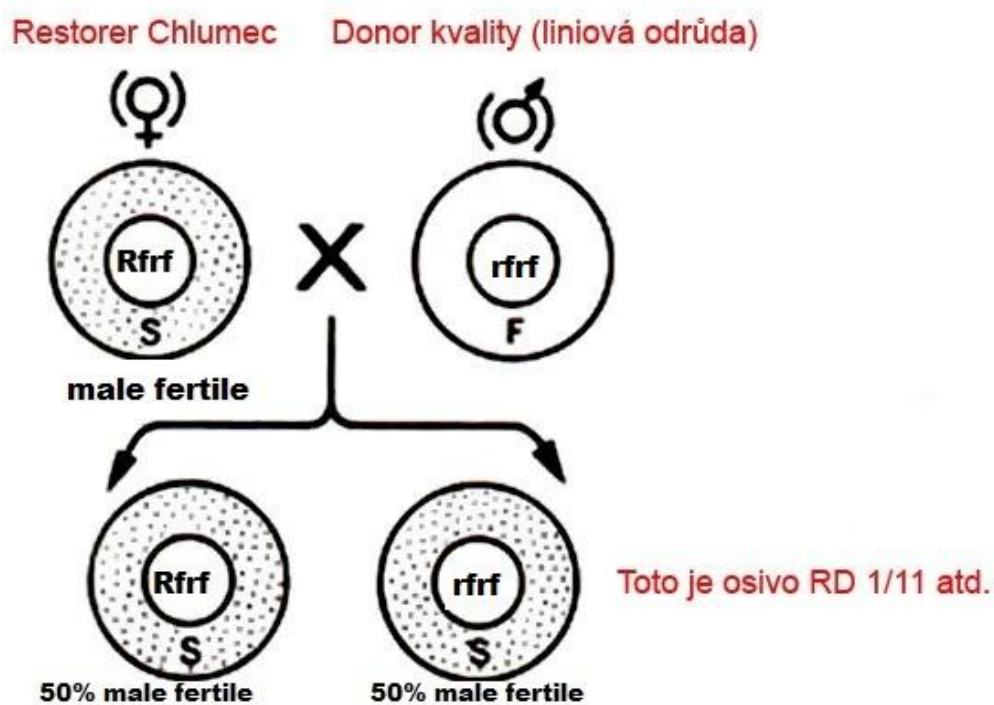
#### 3.1 Materiál

V diplomové práci byl použit rostlinný materiál, ze kterého byla izolována DNA.

Rostlinný materiál CMS *Ogu*-INRA poskytly šlechtitelské stanice Selgen Chlumeck a Oseva PRO (tab. č. 4). Materiál byl použit ke screeningu technikou PCR. U jednotlivých rostlin jsem zjišťovala, zda nesou gen *Rf* pro obnovu fertility.

Pomocí specifických primerů (RsPPRF2 a RsPPRR2) byl testován soubor 53 rostlin na přítomnost *Rf* genu. Jednalo se o CMS, dihaploidní *Rf* a F<sub>1</sub> hybridy (213-296) a dále o pět restorerů (RD1-RD5, obr. č. 10).

Obr. č. 10 Vznik DH jedinců (RD1-RD5)



Na testování primerů AI a optimalizaci podmínek PCR reakce byl použitý AI rostlinný materiál (tab. č. 5). Rostlinný materiál poskytli ÚRV Praha a VÚO Opava.

AI rostlinný materiál (tab. č. 6) byl použit k detekci *S II* haplotypu. AI rostlinný materiál je  $F_1$  hybrid vzniklý křížením dvou různých AI rostlin.

**Tab. č. 4 Použitý rostlinný materiál CMS Ogu-INRA.**

Číslo vzorku (název)					
213 ( <i>RfRf</i> )	230 (CMS)	258 ( $F_1$ )	267 ( $F_1$ )	280 (CSM)	289 ( <i>RfRf</i> )
216 ( <i>RfRf</i> )	233 (CMS)	259 ( $F_1$ )	268 ( $F_1$ )	281 (CSM)	291 ( <i>RfRf</i> )
217 ( <i>RfRf</i> )	251 ( <i>RfRf</i> )	260 ( $F_1$ )	271 ( <i>RfRf</i> )	282 (CSM)	296 ( <i>RfRf</i> )
218 ( <i>RfRf</i> )	252 ( $F_1$ )	261 ( $F_1$ )	273 ( <i>RfRf</i> )	283 (CSM)	RD 1/11 ( <i>Rfrf</i> nebo <i>rfrf</i> )
219 ( <i>RfRf</i> )	253 ( $F_1$ )	262 ( $F_1$ )	275 (CSM)	284 (CSM)	RD 2/11 ( <i>Rfrf</i> nebo <i>rfrf</i> )
220 ( <i>RfRf</i> )	254 ( $F_1$ )	263 ( $F_1$ )	276 (CSM)	285 (CSM)	RD 3/11 ( <i>Rfrf</i> nebo <i>rfrf</i> )
221 ( <i>RfRf</i> )	255 ( $F_1$ )	264 ( $F_1$ )	277 (CSM)	286 (CSM)	RD 4/11 ( <i>Rfrf</i> nebo <i>rfrf</i> )
222 ( <i>RfRf</i> )	256 ( $F_1$ )	265 ( $F_1$ )	278 (CSM)	287 ( $F_1$ )	RD 5/11 ( <i>Rfrf</i> nebo <i>rfrf</i> )
223 ( <i>RfRf</i> )	257 ( $F_1$ )	266 ( $F_1$ )	279 (CSM)	288 ( <i>RfRf</i> )	

Legenda: *Rf* – rostlinný materiál je obnovitelem fertility

CMS – rostlinný materiál není obnovitelem fertility

$F_1$  -  $F_1$  hybrid

**Tab. č. 5 Testovaný rostlinný materiál pro autoinkompatibilní šlechtění.**

Číslo vzorku			
248 (AI)	62 (AK) D <sub>4</sub>	242(AI)	243(AI)
55 (AK) D <sub>1</sub>	172 (AI)	249(AK) D <sub>5</sub>	245(AI)
56 (AK) D <sub>2</sub>	173(AI)	244(AI)	246(AI)
54 (AK) D <sub>3</sub>	174(AI)	250(AK) D <sub>6</sub>	247(AI)

Legenda: AI – autoinkompatibilní linie

AK – autokompatibilní linie (donoři kvality)

Názvy donorů kvality: D<sub>1</sub> – DK Cabernet, D<sub>2</sub> – Da Vinci, D<sub>3</sub> – Chagall, D<sub>4</sub> – Wisent, D<sub>5</sub> – AK1 OPV 22/17, D<sub>6</sub> – AK1 OPV 20/9

**Tab. č. 6 Rostlinný materiál pro autoinkompatibilní šlechtění.**

Číslo vzorku					
AIK1	AIK2	AIK3	AIK4	AIK5	AIK6
AIK1/2	AIK2/2	AIK3/2	AIK4/2	AIK5/2	AIK6/2

## NAVRŽENÍ PRIMERŮ

- PCR reakce pro zjištění obnovitele fertility

V této práci byly primery (tab. č. 7) navrženy v úseku genu kódující PPR-B protein, který má vliv na syntézu tzv. „sterilních“ proteinů (Uyttewaal *et al.*, 2008). Přítomnost ampliconu o velikosti přibližně 2200 pb detekuje restorery. Tyto nově navržené primery byly vytvořeny v homologním úseku po alignmentu sekvencí FJ593505.1; EU163283.1; EU163282.1; AB326285.1; AB326284.1; DQ445625.1. Tyto primery byly navrženy jen na základě programu Primer3.



**Tab. č. 7 Navržené primery v úseku genu kódující PPR protein**

Primer	Nukleotidová sekvence
RsPPRF2	TGACATGCTTCGATCTCGTC
RsPPRR2	GAAGCTCTTGCTACCCATCG

- Testování primerů pro AI a optimalizace podmínek PCR reakce

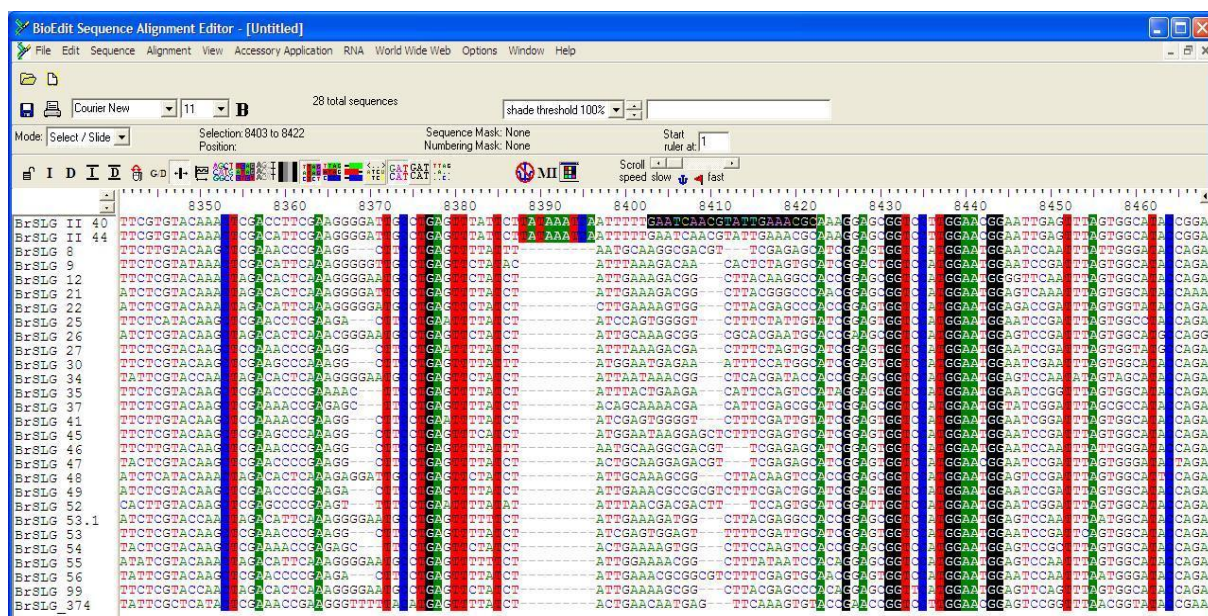
Navržené primery (BrSLGIIF a BrSLGIIR, tab. č. 8) detekující *S II* haplotyp u *B. rapa* byly vytvořeny z dostupných sekvencí v NCBI (AB008190.1 *Brassica rapa* gene for SLG29; AB054058.1 *Brassica rapa* SLG40 mRNA for *S* locus; AB054059.1 *Brassica rapa* SLG44 mRNA for *S* locus). U těchto primerů byla testována a optimalizována teplota nasedání ( $T_m$ ) v uvedeném teplotním rozmezí (54 °C, 55 °C, 56 °C a 58 °C).  $T_m$  byla stanovena pomocí  $T_m$  kalkulátoru od AB (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>).

Tyto primery byly navrženy v úseku, který byl specifický pouze pro *S II* haplotyp u *B. rapa* (obr. č. 11 a 12). Vzhledem k náročnosti byly tyto primery navrženy ručně na základě pravidel při navrhování primerů (délka primeru 17-25 b, obsah GC 50-55 %, pokud možno s G nebo C na 3' konci, vyvarovat se dlouhého opakování jedné báze, zvláště na 3' konci, ověřit si, zda primer netvoří sekundární struktury nebo dimery (oligomery). Ujistit se, že teplota pro annealing primeru je 55 °C nebo vyšší a pokud je nižší, nedojde ke tvorbě značených fragmentů. Ověřit si, zda v templátu skutečně existuje jen jedno zcela komplementární místo pro primer a že nejsou přítomna alternativní hybridizační místa. Primer pokud možno dodávat v koncentraci 10 pmol/μl).

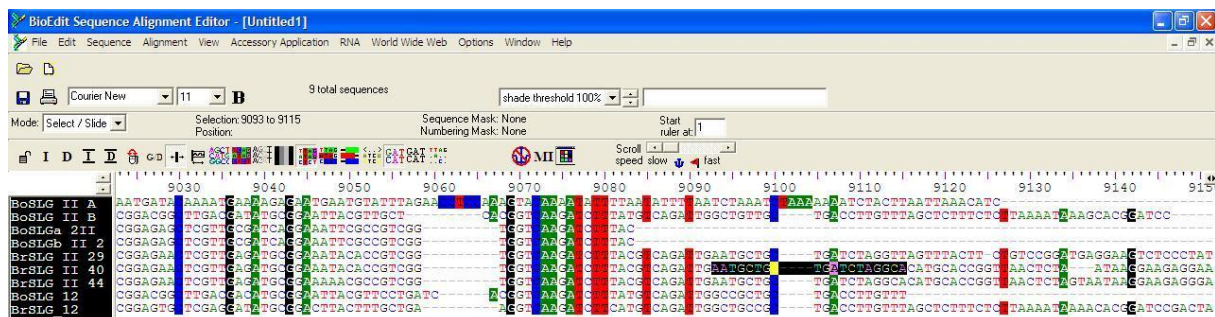
Tab. č. 8 Navržené primery detekující S II haplotyp u *B. rapa*

Primer	Nukleotidová sekvence
BrSLGIIF	GAATCAACGTATTGAAACGC
BrSLGIIR	TGCCTAGATCAGCAGCATT

Obr. č. 11 Princip hledání v BioEditu specifického úseku v rámci genomu *B. rapa* pro F primer. Římská II u dvou BrSLG je recesivní S II haplotyp. U zbylých 26-ti BrSLG je dominantní S I haplotyp.



**Obr. č. 12** Princip hledání v BioEditu specifického úseku při použití sekvenci *B. rapa* i *oleracea* pro *R* primer. *BoSLG* a *BrSLG* je pro kontrolu specifity recesivního haplotypu. Římská II je recesivní *S II* haplotyp.



- AI k detekci *S II* haplotypu

V této práci byl použitý primerový pár *BrSLGIIR* a *BrSLGIIF*. Tento primerový pár detekující *S II* haplotyp u *B. rapa*.

V metodě PCR-RFLP byly použity specifické primery *e* a *f* (tab. č. 9) k detekci *S II* haplotypu *B. oleracea*.

**Tab. č. 9** Primery *e* a *f* použité v metodě PCR-RFLP (Brace et al., 1993; Zhang et al., 2008)

Primer	Nukleotidová sekvence
e	CAGCATCTACTCGAGATTGAC
f	AAA(A/C/G)CCATCTCCACTGCAGCT

### 3.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)

- Připravíme roztok 2x CTAB- PVP a 1 % merkaptoethanol, na 1 vzorek 500  $\mu$ l roztoku (tj. 495  $\mu$ l CTAB- PVP a 5  $\mu$ l 1 % merkaptoethanol). Připravený roztok dáme předehřát na 65°C.
- Do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA.
- Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l předehřátého pufru, pletivo rozdrťíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace cca 15 min lehce promícháme.
- Přidáme 500  $\mu$ l chloroformu s IAA, směs se 10 min promíchává a následně centrifuguje 5 min při 12000 rpm.
- Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5 % CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500  $\mu$ l chloroform-IAA a 10 min protřepáváme. Centrifugujeme 5 min maximální rychlostí při pokojové teplotě.
- Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu ledového isopropanolu a 2-3x lehce promícháme. Dáme na 30 min do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min při 4°C maximální rychlost. Odstraníme supernatant.
- Přidáme 300  $\mu$ l millipore H<sub>2</sub>O a necháme 30 min inkubovat při 37°C. Promícháme.
- Přidáme 2 objemy ledového (z mrazáku) 100 % ethanolu, 2-3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min.
- Vzorky 10 min centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. Odstraníme supernatant.

- Přidáme 1 ml ledového 70% ethanolu, 2-3 x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min maximální rychlost při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit.
- Přidáme 80 µl millipore H<sub>2</sub>O a skladujeme při -20°C.

### 3.3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

PPP Master Mix (Top-Bio) již obsahuje hořčík, nukleotidy, PCR pufr a DNA polymerázu a tím výrazně snižuje čas pro přípravu PCR reakce, a tím se i snižuje chybovost při přípravě v rámci pipetovacích kroků.

#### PCR reakce pro zjištění obnovitele fertility

PCR reakce: Master mix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O	9 µl
RsPPRF2	1,25 µl
RsPPRR2	1,25 µl
<u>DNA</u>	<u>1 µl</u>
Celkem	25 µl

Termocycler: 1. <u>95°C</u>	<u>5 min úvodní denaturace</u>
2. 95°C*	30 sekund (denaturace)
3. 60°C*	30 sekund (annealing – nasedání primerů)
4. <u>72°C*</u>	<u>2 min (elongace - prodlužování řetězce)</u>
6. 72°C	10 min (konečná elongace)
7. 4°C	nekonečno (chlazení)

\* Kroky 2.-4. se opakovaly 30x.

## Testování primerů pro AI a optimalizace podmínek PCR reakce

PCR reakce byla také použita v dalším kroku (AI k detekci S II haplotypu).

Master mix	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
BrSLGIIR	1 $\mu$ l
BrSLGIIF	1 $\mu$ l
<u>DNA</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
Celkem	20 $\mu$ l

Termocycler: 1. 95°C 5 min úvodní denaturace

2. 95°C*	30 sekund (denaturace)
3. 58°C**	30 sekund (annealing – nasedání primerů)
4. <u>72°C*</u>	<u>2 min (elongace - prodlužování řetězce)</u>
5. 72°C	10 min (konečná elongace)
6. 4°C	nekonečno (chlazení)

\*Kroky 2.-4. se opakovaly 35x.

\*\*Krok 3.: vzorky byly dány do termocykleru, které měly nastavenou různou annealingovou teplotu (58 °C, 56 °C, 55 °C, 54°C).

## AI k detekci S II haplotypu

Termocycler: 1. 94°C 2 min úvodní denaturace

2. 94°C*	30 sekund (denaturace)
3. 55°C*	45 sekund (annealing – nasedání primerů)
4. <u>72°C*</u>	<u>1 min (elongace - prodlužování řetězce)</u>
5. 72°C	10 min (konečná elongace)
6. 4°C	nekonečno (chlazení)

\*Kroky 2.-4. se opakovaly 30x.

### PCR-RFLP

PCR reakce (e+f): Master mix	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,4 $\mu$ l
Primer e	0,8 $\mu$ l
Primer f	0,8 $\mu$ l
<u>DNA</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
Celkem	20 $\mu$

Termocycler: 1. <u>94°C</u>	<u>5 min úvodní denaturace</u>
2. 94°C*	30 sekund (denaturace)
3. 60°C*	45 sekund (annealing – nasedání primerů)
4. <u>72°C*</u>	<u>1 min (elongace - prodlužování řetězce)</u>
5. 72°C	10 min (konečná elongace)
6. 4°C	nekonečno (chlazení)

\*Kroky 2.-4. se opakovaly 30x.

v dalším kroku byla použita DNA z PCR reakce (primery e+f):

Reakce: <i>Mbo</i> I	0,2 $\mu$ l
IOX pufr	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3,8 $\mu$ l
<u>DNA</u>	<u>5 <math>\mu</math>l</u>
Celkem	10 $\mu$ l

Reakce probíhala 2 hod. při 37 °C

## Elektroforéza

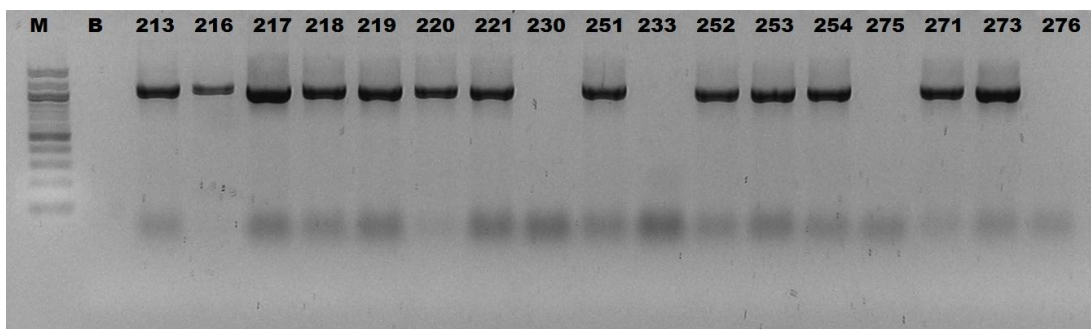
V této práci byly PCR produkty analyzovány na 1,5 % agarózovém gelu, který se pouštěl v 1 % TBE při napětí 30 V a přibližně po 10 minutách se napětí zvýšilo na 80 V. Pro vizualizaci amplikonů byl přidán do agarózového gelu ethidiumbromid, který je viditelný pod UV světlem. Velikost fragmentů se určovala pomocí 100 pb Ladderu.

## 4 VÝSLEDKY

### PCR reakce pro zjištění obnovitele fertility

Výchozí materiál CMS *Ogu-INRA* nesoucí geny obnovy fertility (*Rf* a  $F_1$ ) se projevil na agarózovém gelu přítomností proužku, zatímco u CMS se proužek neobjevil (obr. č. 13). Velikost amplifikovaných fragmentů byla přibližně 1100 pb. Je ověřeno, že markerový pár (RsPPRF2 a RsPPRR2) spolehlivě funguje.

**Obr. č. 13** *Elektroforetický snímek, CMS Ogu-INRA nesoucí geny obnovy fertility (Rf a F<sub>1</sub>) se projevil přítomností proužku, zatímco u CMS se proužek neobjevil*



Z celkového počtu 53 rostlin byla pomocí PCR reakce s použitím navržených primerů (RsPPRF2 a RsPPRR2) detekována přítomnost *Rf* genů u 21 rostlin obnovitelů fertility a 18  $F_1$  hybridů. U zbylých 14 CMS rostlin bylo potvrzeno, že nenesou gen pro obnovu fertility. V tab. č. 10 je podrobně znázorněno, které rostliny nesou gen obnovy fertility. Žlutě označené jsou rostliny, které jsou obnovitelé a nesou gen *Rf*, zeleně jsou označené rostliny, který tento gen nenesou.



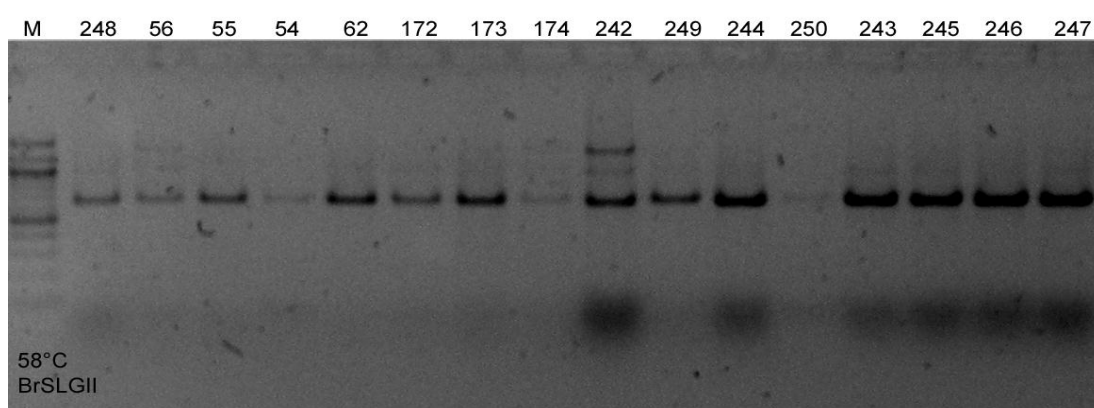
**Tab. č. 10 Podrobný popis rostlinné materiálu CMS Ogu-INRA, *Obnovitel fertility* – nese gen obnovy fertility (*Rf*); *není obnovitel fertility* - nenesé gen obnovy fertility (*Rf*)**

Číslo vzorku	Číslo vzorku	Číslo vzorku	Číslo vzorku	Číslo vzorku	Číslo vzorku
213	230	258	267	280	289
216	233	259	268	281	291
217	251	260	271	282	296
218	252	261	273	283	RD1/11
219	253	262	275	284	RD2/11
220	254	263	276	285	RD3/11
221	255	264	277	286	RD4/11
222	256	265	278	287	RD5/11
223	257	266	279	288	

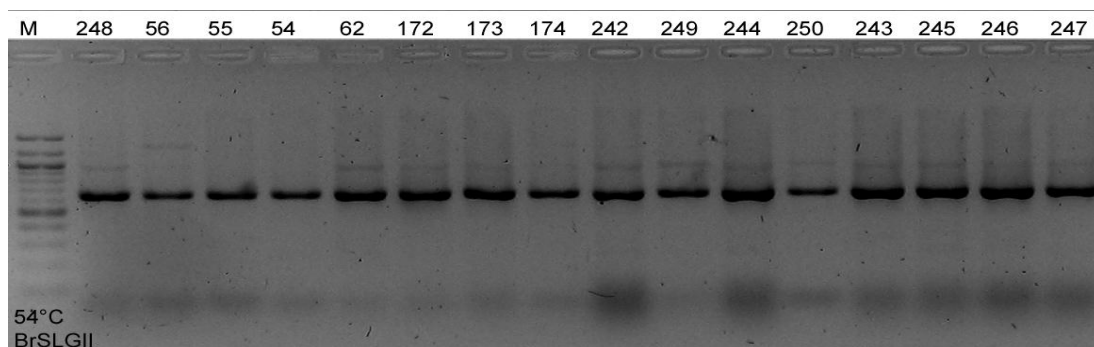
### **Testování primerů pro AI a optimalizace podmínek PCR reakce**

Přestože docházelo s použitím vyšších teplot annealingu k vyšší specifitě nasedání, nebylo v testovaném rozmezí nalezeno vhodné teplotní optimum. Větší nespecifita nasedání primerů BrSLGIIF a BrSLGIIR je patrná z obrázku 15 ( $T_m=54^\circ\text{C}$ ), zatímco u teploty  $58^\circ\text{C}$  dochází k nižší amplifikaci zejména u AK vzorků 248, 56, 55, 54, a 250. U AI vzorků 172 a 174 byla pravděpodobně nižší kvalita DNA. Velikost amplifikovaných fragmentů byla přibližně 665 pb.

*Obr. č. 14 Elektroforetický snímek, nasedání primeru BrSLGII při teplotě annealingu 58 °C.*



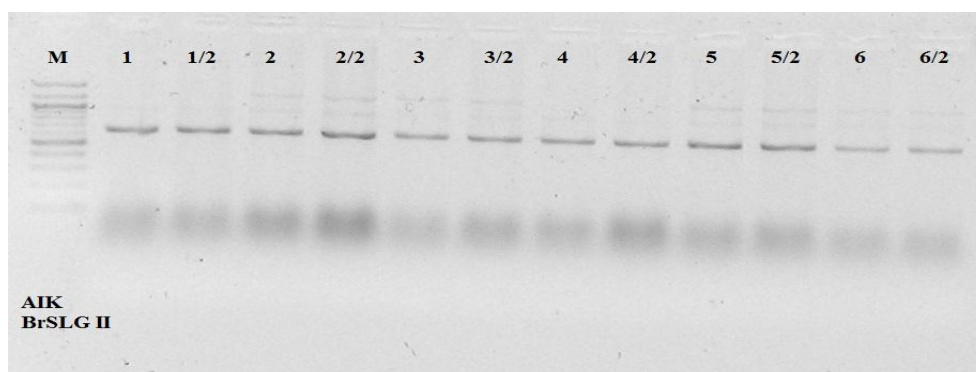
*Obr. č. 15 Elektroforetický snímek, nespécifické nasedání primeru BrSLGII při teplotě annealingu 54 °C.*



## AI k detekci S II haplotypu

Navržené primery BrSLGIIF a BrSLGIIR detekují u všech rostlin *oleracea* S II haplotyp. U všech AI rostlin byly detekovány amplifikované fragmenty. Fragmenty byly velké přibližně 665 pb (obr. č. 16).

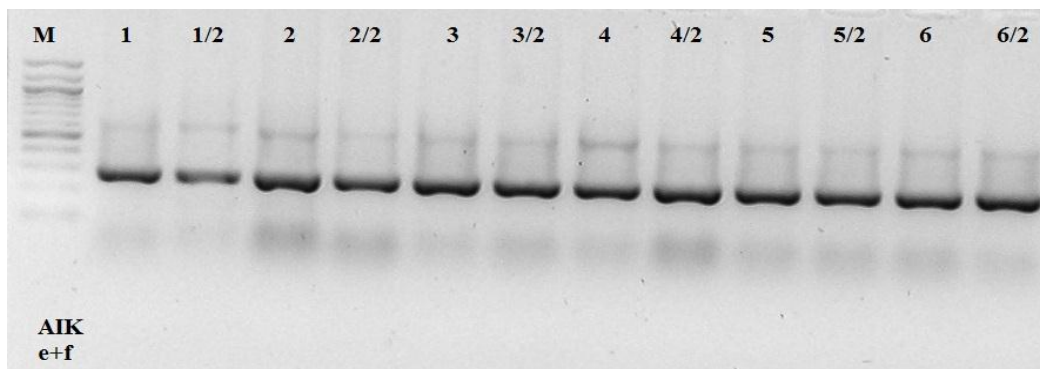
**Obr. č. 16 Elektroforetický snímek, detekce S II haplotypu pomocí primerového páru BrSLGIIF a BrSLGIIR**



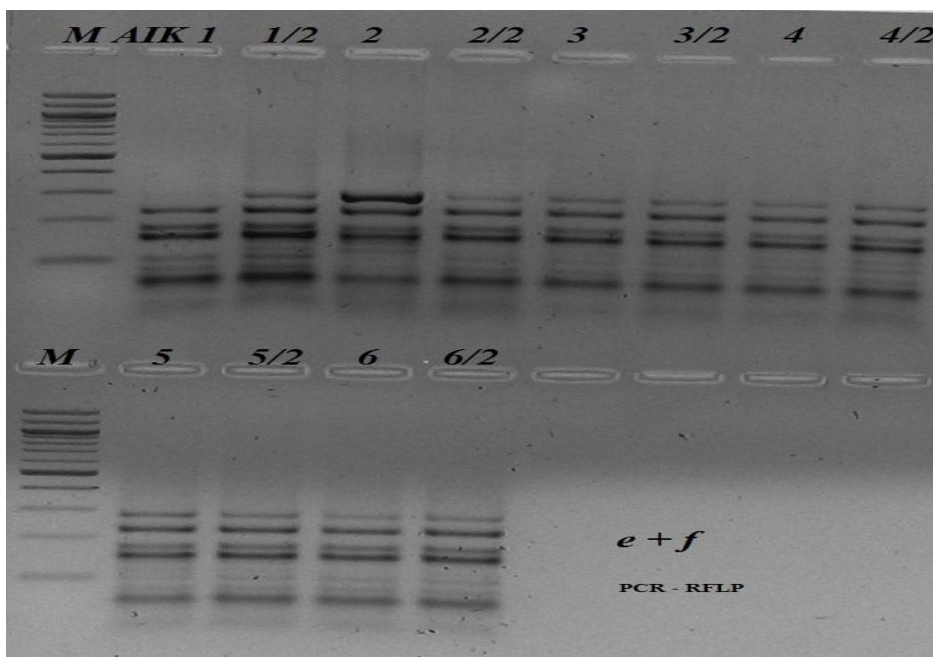
## PCR-RFLP

Pomocí PCR reakce se specifickými primery e a f (obr. č. 17; Brace *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2008) se amplifikovala sekvence o velikosti 280 pb z S lokusu genomu *B. oleracea*. Amplifikovaný fragment DNA se štěpil restriční endonukleázou *Mbo*I. Na základě štěpných profilů nebyla detekována variabilita způsobená přítomností více haplotypů (obr. č. 18).

*Obr. č. 17 Elektroforetický snímek, amplifikace fragmentu S lokusu genomu B. oleracea pomocí e a f primerů*



*Obr. č. 18 Elektroforetický snímek, PCR-RFLP analýza genu SLG I u spektra odrůd za použití restriktázy MboI.*



## 5 DISKUZE

Hybridnímu šlechtění se v České republice věnuje málo firem, i když patříme mezi pět největších pěstitelů řepky v Evropě. Zahraniční konkurence je vysoká díky jiným šlechtitelským podmínkám a dále vzhledem k dostupným finančním prostředkům. Evropské šlechtění ozimé řepky je soustředěno na stanicích ve Francii a Německu, naopak v Kanadě a Austrálii jsou vyvíjeny hybridy řepky jarní. Podle Agrotipu (2012) není rozdíl výnosu mezi hybridní a linií odrůdou v maloparcelních pokusech větší než 10 %. Důležitější je však chování hybridů na velkých plochách přímo v praxi. Pro zachování českých odrůd řepky a tím i českých firem doporučuji zkrátit a zefektivnit šlechtitelský proces, například zvýšením výnosu semene, zlepšením výnosové stability nebo lepší zimovzdorností.

Koprna *et al.* (2012) zjistil, že na základě testu obnovy fertility u hybridního potomstva bylo v letech 2004 - 2007 získáno 80 linií obnovitele fertility se schopností obnovy nad 80 % z celkového počtu 284 testovaných linií na přítomnost *Rf* genu. Z tohoto počtu mělo 58 linií obnovitele (72,50 %) obsah GSL v pod hranici 18  $\mu\text{mol/g}$  semene. Z celkového počtu sledovaných linií obnovitele mělo 65 schopnost obnovy fertility v  $F_1$  generaci nad 90 %, z toho 45 linií (69,23 %) mělo obsah GSL v semeni pod stanovenou hranici 18  $\mu\text{mol/g}$  semene. Po ověření kvality a schopnosti obnovy fertility nad 95 % v  $F_1$  generaci bylo vybráno 7 linií obnovitelů fertility pro zásev množitelské plochy experimentálních *Ogu*-INRA hybridů v roce 2006. Vyšší výskyt linií obnovitelů nesoucích *Rf* gen, kteří obnovují fertilitu od 40 do 60 % v generaci  $F_1$  (32,39 % výskytu) a linií obnovujících fertilitu nad 90 % (22,89 % výskytu), pravděpodobně potvrzuje údaje Delourme *et al.* (1998) o principu obnovy fertility u systému *Ogu*-INRA. Její úroveň závisí na toho, zda-li má otcovský komponent geny obnovy fertility v heterozygotní formě *Rf/rf* nebo v homozygotní dominantní formě *Rf/Rf*. Linie nesoucí homozygotní formu genu obnovy *Rf/Rf* jsou pravděpodobně schopny obnovovat fertilitu nad hranici 90 % v generaci  $F_1$  (Koprna *et al.*, 2012).

Koprna *et al.* (2007) v analýze použil marker SG34 typu SCAR. Tento marker umožňuje odlišení pylově sterilních rostlin (S)*rfrf* od pylově fertálních (S)*Rfrf* a (S)*RfRf*. Odlišení pylově fertálních homozygotů od heterozygotů není v případě dominantních SCAR markerů možné. Proto byla analyzována generace F<sub>1</sub>, kde v případě použití dominantního homozygota pro gen obnovy jako opylovače byl předpoklad, že všechny rostliny v hybridní generaci budou mít jednu dominantní alelu (*Rf*) genu obnovy fertility. V případě nakřížení heterozygotní (*Rfrf*, *rFRf*), či recesivně homozygotní (*rfrf*) formy obnovitele na sterilní tester by měly nést rostliny v hybridní generaci dominantní nejen alelu pro gen obnovy (*Rf*), ale i recesivní formu genu (*rf*). Toto je jediná spolehlivá možnost, jak docílit využití SCAR markerů pro detekci linií obnovitelů fertility, nevýhodou je však nutnost analýzy většího souboru rostlin (v tomto případě 10 rostlin). Další možností, která je již ve fázi realizace je detekce dominantních homozygotních linií obnovitele po odvození dihaploidů z mikrosporových kultur. V tomto případě se jedná o homozygoty, tudíž by měl být dihaploidizací eliminován jakýkoliv výskyt heterozygotů.

V této části diplomové práce byl testován nový marker detekující gen obnovy fertility (*Rf*) u rostlinného materiálu CMS *Ogu-INRA*. Primerový pár RsPPRF2 a RsPPRR2 byl vytvořen v kódující oblasti pro PPR-B protein, který se podílí na obnově fertility u CMS *Ogu-INRA*. Tak jako v případě výše zmiňovaného markeru SG34, nelze ani v tomto případě odlišit nositele s heterozygotní formou tohoto genu (tj. *Rfrf*). Tento fakt však vzhledem k povaze testovaného materiálu (DH regeneranti) nezpůsobil žádné problémy. Z 53 rostlin byl u 39 rostlin detekován gen *Rf*. Tato shoda byla v souladu s charakterem rostlin (tj. *Rf* gen byl detekován u restorerů a F1 hybridů, zatímco u CMS linií a jejich udržovatelů nedocházelo k detekci přítomnosti tohoto genu). V případě testování vzorků RD1-RD5 se naopak jednalo o recesivní homozygoty, nebo heterozygoty, tudíž i v tomto případě byl princip selekce optimální.

Při testování primerů BrSLGIIF a BrSLGIIR pro AI rostliny a jejich optimalizaci podmínek PCR reakce docházelo při použití nižších teplot nasedání primerů k amplifikaci u všech testovaných vzorků. V případě horní hranice

testovaného rozmezí teplot ( $T_m=58^\circ\text{C}$ ), docházelo u většiny pravděpodobných nositelů recesivního *S II* haplotypu z *B rapa* (AI rostlin) k výraznější amplifikaci, na rozdíl od donorů kvality, kteří jsou pravděpodobnými nositeli dominantního *S*<sup>47</sup> haplotypu ve svém genomu původem z *B. rapa*. Důvodem přítomnosti amplikonů i u rostlin s dominantním *s* haplotypem může být nespecifita použitých primerů. Tyto primery byly vyvinuty po aligmentu 26-ti dostupných *S I* haplotypů pro gen *SLG* a třech recesivních. Vytvořené primery jsou unikátní pro recesivní haplotypy *SLG* genu u genomu *B. rapa*, avšak při porovnání se stejnou oblastí v genomu *B. oleracea* může v některých případech docházet k amplifikaci (např. u částečné sekvence *SLG-B* genu u *B. oleracea* (AJ306582.1) se sekvence horního primeru liší pouze v jednom nukleotidu GAATCAACGTGTTGAAACGC.

Dolanská *et al.* (2004) uvádí, že autoinkompatibilita u odrůd, donorů kvality a autoinkompatibilních linií *Brassica napus* byla analyzována použitím identifikace *S* lokusu. U několika odrůd *B. napus* byl *SLG* gen *S* lokusu detekován jako dominantní a druhý jako recesivní. Technika detekce recesivní autoinkompatibility založená na principu použití specifických primerů pro geny *SLGI*, nebo *SRKI* byla u řepky olejky mnohokrát ověřena tj. primery PS5 a PS15 - Nishio *et al.*, 1996, *SLGa* – Zhang 2008, PK1 a PK4 - Nishio *et al.*, 1997 atd. V této práci byla zvolena opačná strategie a to detekce AI rostlin na základě identifikace přítomnosti recesivního *S II* haplotypu v A genomu. K tomuto účelu byly použity primery BrSLGIIF a BrSLG II R, jejichž amplifikací byl odhalen recesivní gen ve všech analyzovaných vzorcích (autokompatibilních i autoinkompatibilních).

Vzhledem k poměrně vysoké homologii mezi úseky dominantního a recesivního *SLG* genu a také s ohledem na přítomnost dvou vzájemně podobných genomů (A a C), lze usuzovat, že docházelo při použití těchto primerů k nespecifické amplifikaci i v jiných oblastech. PCR je stále jednou z nejpoužívanějších metod, která není náročná na čas ani finance. Dále metoda PCR-RFLP, které byla také použita v této diplomové práci, se využívá i k charakterizaci odlišných *S*-alel u *B. napus* (Brace *et al.* 1993; Mohring *et al.*, 2005) či k restričnímu štěpení genu *SLG* amplifikovaného pomocí klasické PCR. V PCR reakci se použily primery e a f, který detegují

*S* lokusy. Fragment DNA se štěpil restrikcí endonukleázou *Mbo*I. Po elektroforetické separaci na gelu nebyl detekovat polymorfismus uvnitř sekvencí. Výběrem vhodného genetického markeru lze efektivně vybrat šlechtitelský materiál a identifikovat AI linie a geny obnovy fertility potřebné k hybridnímu šlechtění.

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* a u druhu *Brassica napus* je detekováno 50 alel (Nou *et al.*, 1993). Při studiu druhu *Brassica campestris* Nishio *et al.* (1996) našli a publikovali primery PS 5, PS 15 a PS 18, které amplifikují fragmenty genu *SLG I* (Kukolíková, 2012).

Park *et al.* (2001) prováděl svá testování na odrůdách zelí (*Brassica oleracea* L.) a brokolice (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*). Pomocí 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 amplifikovaly fragment 1150 pb ve všech sledovaných 40 liniích. U tří z 20 linií byly pro amplifikaci 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 restrikcí endonukleáz a vybrali tu, která bude nejlépe korespondovat s výsledky dialelního křížení. Jako nejlepší se jim jevila *Hinf*I. Výsledky, které štěpení poskytovalo, se plně shodovaly se sekvenční nukleotidovou analýzou. PCR-RFPL byla nejrychlejší 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 (Kukolíková, 2012).



## 6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace metod PCR analýzy a vývoj markerů pro selekci cílových rostlin v programech hybridního šlechtění řepky.

Rostlinný materiál CMS *Ogu*-INRA nesoucí geny obnovy fertility se testoval navrženými primery RsPPRF2 a RsPPRR2. Tímto markerem detekujícím gen obnovy fertility se prokázala jeho účinnost vzhledem k specifické amplifikaci u *Rf* a  $F_1$  hybridů, zatímco u CMS linií a jejich udržovatelů nedocházelo k detekci přítomnosti tohoto genu.

Byla provedena optimalizace podmínek PCR reakce. Neoptimálnější teplota nasedání testovaných primerů BrSLGIIF a BrSLGIIR byla z testovaného rozmezí 58 °C. Přesto docházelo k amplifikaci i u AK rostlin. U tohoto markeru existuje možnost dosáhnout vysoké specifity, avšak po podrobnějších a náročnějších optimalizacích, které již nemohly být pro svou objemnost a finanční náročnost zahrnuty do této diplomové práce.

Navržené primery BrSLGIIF a BrSLGIIR se testovaly u AI rostlin. U všech AI rostlin byly detekovány amplifikované fragmenty. Technikou PCR-RFLP byl testován soubor AI rostliny (resp.  $F_1$  hybridů vzniklých po křížení AI linií s odlišnými *S II* haplotypy) u nichž nebyl ve sledovaném úseku detekován polymorfismus.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Agrotip** (2012): Význam hybridů ozimé řepky, Informační měsíčník BASF pro české a slovenské zemědělce, Agrotip, p. 1-20.
- Bateman, A.J.** (1955): Self-incompatibility Systems in Angiosperms: III, Cruciferae. *Heredity* 9, p. 52-58.
- Baranyk, P.** (2012): Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2011/12 seznam doporučených odrůd, svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, dostupné z: <http://www.spzo.cz/stanovisko-repka/> (staženo dne 9.10.2012).
- Bečka, D.; Vašák, J; Zukalová, H.; Mikšík, V.** (2007): Řepka ozimá – pěstitelský rádce, MZE, Praha.
- Blažková, M.; Fukal, L.; Rauch, P.** (2010): Nebezpečný patogen *Enterobacter sakazakii* a jeho detekce, *Chemické Listy*, 104, p. 113-118.
- Brace, J.; Ockendon, D. J.; King, G. J.** (1993): Development of a method for the identification of *S* alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases, *Sexual Plant Reproduction*, 6, p. 133-138.
- Brace, J.; Ockendon, D. J.; King, G. J.** (1994): A molecular approach to the identification of *S*-alleles in *Brassica orelacea*, *Sexual Plant Reproduction*, 7, p. 203-208.
- Brown, T.** (2007): Klonování genů a analýza DNA, 1. české vydání, přeložil Martin Fellner, Univerzita Palackého, Olomouc, p. 389.
- Český statistický úřad** (2012): Vývoj osevních ploch a první odhad sklizně, p. 1-12.
- Čurn, V.; Havlíčková, L.; Vondrášková, E.; Kučera, V.; Vyvadilová, M.; Klíma, M.** (2012): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, dostupné z:

<http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Metodiky-Metodika-i-0421982163.pdf> (staženo dne 1.1.2013).

**Delourme, R.; Foisset, N.; Horvais, R.; Barret, P.; Champagne, G.; Cheung, W.Y.; Landry, B.S.; Renard M.** (1998): Characterisation of the radish introgression carrying the Rfo restorer gene from the *Ogu*-INRA cytoplasmatic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Theoretical and Applied Genetics*, 97, p. 129-134.

**Demnerová, K.** (2012): Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu, *Chemické Listy*, 106, p. 920-925.

**Diepenbrock, W.; Fischbeck, G.; Heyland, K.U.; Knauer, N.** (1999): Spezieller Pflanzenbau, 3. Aufl., Eugen Ulmer, Stuttgart.

**Dolanská, L.; Čurn, V.** (2004): Analysis of SLG gene – the molecular marker in hybrid breeding of oil seed rape, *Journal of Central European Agriculture*, 5 (1), p. 23-28.

**González-Melend, P.; Uyttewaal, M.; Morallo, C.N.; Mora, J.R.H.; Fajardo, S.; Budar, F.; Luca, M.M.** (2008): A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in *Ogu*-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*), *Journal of Experimental Botany*, 59(4), p. 827-838.

**Handryš, M.; Balick, M.; Schierwater, B.** (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Molecular Ecology*, 1, p. 55-63.

**Hochel, I.** (2009): Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp., *Chemické Listy*, 103, p. 814-822.

**Koprna, R.** (2007): šlechtění řepky na kvalitu, XII. Seminář šlechtitelů – souhrn přednášek, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav pěstování, šlechtění a rostlinolékařství, p.7-9.

**Koprna, R.** (2008): Využití hybridního systému *Ogu*-INRA při šlechtění řepky ozimé, Doktorská disertační práce, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita

v Brně, Agronomická fakulta, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, p. 109.

**Koprna, R.; Macháčková, I.; Horáček, J.; Ehrenbergerová J.** (2012): Využití hybridního systému *Ogu-INRA* při šlechtění řepky ozimé, dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/bioros/koprna.pdf> (staženo dne 23.10.2012).

**Kukolíková, B.** (2012): Využití vybraných selekčních molekulárních markerů při šlechtění řepky, disertační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

**Kumar, P.; Gupta, V. K.; Misra, A. K.; Modi, D. R.; Pandey, B.K.** (2009) Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology, *Plant Omics Journal*, 2(4), p. 141-162.

**Kwon, W. Y.; Kim, D.-S.** (2001): Herbicide-resistant genetically-modified crop: its risks with an emphasis on gene flow, *Weed Biology and Management*, 1, p. 42–52.

**Liu, Z. J.; Cordes, J. F.** (2004): DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture*, p. 238 (1-37).

**Maoteng, L.; Wei, Q.; Xin; Ch.; Jinling, M.** (2010): The progress of intersubgenomic heterosis studies in *Brassica napus*, *African Journal of Biotechnology*, 9(11), p. 1543-1550.

**Maxam, A. M.; Gilbert, W.** (1977): A new method for sequencing DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74 (2), p. 560-564.

**Mohring, S.; Horstmann, V.; Esch, E.** (2005): Development of a molekular CAP *S* marker for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different *S* alleles, *Plant Breeding*, 124, p. 105-110.

**Mueller, U. G.; Wolfenbarger LaReesa, L.** (1999): AFLP genotyping and fingerprinting, *Elsevier Science Ltd.*, 14, p. 389-394.

**MZE** (2009) : Situační a výhledová zpráva olejnin, Odbor rostlinných komodit  
Ministerstvo zemědělství ČR.

**Nasrallah, J.B.; Nishio, T.; Nasrallah, M.E.** (1991): The self-incompatibility genes of *Brassica*: expression and use in genetic ablation of floral tissues, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, p. 393-422.

**Nasrallah, J.B.; Nasrallah, M.E.** (1993): Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response, *The Plant Cell*, 5, p. 1325-1335.

**Nicolas, D.S.; Monod, H.; Eber, F.; Chevre, A.-M.; Jenczewski, E.** (2012): Non-random distribution of extensive chromosome rearrangements in *Brassica napus* depends on genome organization, *The Plant Journal*, 70, p. 691-703.

**Nishio, T.; Kusaba, M.; Watanabeand, M.; Hinata, K.** (1996): Registration of *S*-alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment size of *SLGs*, *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 388-394.

**Nishio, T.; Kubasa, M.; Sakamoto, K.; Ockendon, D.J.** (1997): Polymorphism of the kinese domain of the *S*-locus receptor kinase gene (*SRK*) in *Brassica oleracea* L., *Theoretical and Applied Genetics*, 95, p. 335-342.

**Nou, I. S.; Watanabe, M.; Isogai, A.; Hinata, K.** (1993): Comparison of *S*-alleles and *S*-glycoproteins between two wild-type populations of *Brassica campestris* in Turkey and in Japan, *Sexual Plant Reproduction*, 6, p. 79-86.

**Okamoto, S.; Odashima, M.; Fujimoto, R.; Sato, Y.; Kitashiba, H.; Nishio, T.** (2007): Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in *S*-locus genes, *Plant Journal*, 50, p. 391-400.

**Ovesná, J.; Hodek, J.** (2007): Využití AFLP pro DNA genotypizaci rostlin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN978-80-87011-36-2.pdf> (staženo dne 5.1.2013).

- Powell, W.; Morgante, M.; Andre, Ch.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingey, S.; Rafalski, A.** (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, *Molecular Breeding*, *Kluwer Academic Publishers*, Printed in Belgium, 2, p. 225-238.
- Prugar, J.; eds** (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., TISKAP, Praha, p. 168-175.
- Rosypal, S.; Doškař, J.** (1997): Úvod do molekulární biologie, díl třetí (druhé rozšířené vydání), Katedra genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, p. 283.
- Řehout, V.; Čítek, J.; Hradecká, E.** (2005): Genetika II, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, p. 189.
- Sáková, L.; Čurn, V.** (1999): Speciální genetiky (cvičení), Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, p. 75.
- Sanger, F.; Coulson, A. R.** (1975): Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase, *Journal of Molecular Biology*, 94, p. 441-448.
- Sato, Y.; Sato, K.; Nishio, T.** (2006): Interspecific pairs of class II *S* haplotypes having different recognition specificities between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*, *Plant and Cell Physiology*, 47, p. 340-345.
- Shiba, H.; Iwano, M.; Entani, T.; Ishimoto, K.; Shimohato, H.; Che, F.S.; Stta, Y.; Ito, A.; Takada, Y.; Watanabe, M.; Isogai, A.; Takayama, S.** (2002): The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in *Brassica Pollen* Is Regulated at the RNA Level, *The Plant Cell*, 14, 491-504.
- Schopfer, C.R.; Nasrallah, M.E.; Nasrallah, J.B.** (1999): The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*, *Science*, 286, p. 1697-1700.

**Snowdon, R. J.** (2009): Genome analysis and molecular breeding of Brassica oilseed crops, Akademischer Rat am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, der Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen.

**Stein, J.C.; Howlett, B.; Boyes, D.C.; Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B.** (1991): Molecular cloning of a putative receptor protein kinase encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88, p. 8816-8820.

**Suzuki, G.; Kai, N.; Hirose, T.; Fukai, 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 *S*<sup>9</sup> Haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*), *Genetics*, 153, p. 391-400.

**Uyttewaal, M.; Arnal, N.; Quadrado, M.; Martin-Canadell, A.; Vrielynck, N.; Hiard, S.; Gherbi, H.; Bendahmane, A.; Budar, F.; Mireau, H.** (2008): Characterization of *Raphanus sativus* Pentatricopeptide Repeat Proteins Encoded by the Fertility Restorer Locus for Ogura Cytoplasmic Male Sterility, *The Plant Cell*, 20, p. 3331–3345.

**Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper M.; Zabeau, M.** (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Oxford University Press*, 23 (21), p. 4407-4414.

**Zhang, X. G.; 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., *Molecular Breeding*, 21, p. 305–315.

**Zhang, X.G.; Ma, C.Z.; Tang, W.; Tu, J.X.; Shen, J.X.; Fu, T.D.** (2008): Distribution of *S* haplotypes and its relationship with restorer-maintainers of self-incompatibility in cultivated *Brassica napus*, *Theoretical and Applied Genetics*, 117, p. 171-179.

**Zhang, X.; Yin, D.; Zhu, W.; Ma, C.; Fu, T.** (2011): Progress on characterization of self-incompatibility in *Brassica napus* L., *Euphytica*, 182, p. 147-155.

**Zoufalová, J.; Vejl, P.; Melounová, M.; Blažek, J.; Křenilová, J.** (2009):  
Genetické zdroje jabloní a jejich molekulární analýza, *Agriculture*  
(*Poľnohospodárstvo*), 55 (2), p. 69-79.

**Žák, P.** (2009): Nové možnosti sekvenování – sekvenátor GS-FLX, Roche s.r.o.,  
Diagnostics Division, p.5, dostupné z: [http://www.roche-  
diagnostics.cz/download/la/0309/Sekvenator.pdf](http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0309/Sekvenator.pdf) (staženo dne 18.3.2013).

**Žaludová, J.; Kukulíková, B.; Šimáčková, K.; Havlíčková, L.; Čurn, V.** (2012):  
Analysis of sequence polymorphism of SCR class I and II their expression, *Journal*  
*of Central European Agriculture*, 13(2), p. 236-252.

### **Internetový zdroje:**

#### **Agritec, 2012:**

[http://www.agritec.cz/new/index.php?option=com\\_content&view=article&id=29%3Aolejny&catid=16%3Aolejny&Itemid=24&lang=cs](http://www.agritec.cz/new/index.php?option=com_content&view=article&id=29%3Aolejny&catid=16%3Aolejny&Itemid=24&lang=cs) (staženo dne 16.8.2012).

#### **Pioneer, 2001: Using Molecular Markers in Plant Genetics Research**

[http://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/About\\_Global/news\\_media/media\\_library  
/articles/MolecularMarkers.pdf](http://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/About_Global/news_media/media_library/articles/MolecularMarkers.pdf) (staženo dne 21.12.2012).

<http://botany.natur.cuni.cz/fer/markers/Markery3-DNA,PCR,RAPD.pdf> (staženo  
1.1.2013).

[http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-  
probioticky-mikroorganismu](http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probioticky-mikroorganismu) (staženo dne 1.1.2013).

[http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii  
/Prednasky\\_2012/NextGenerationSequencing\\_2012.pdf](http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiversity/prednasky/GenetickeMetodyVZoologii/Prednasky_2012/NextGenerationSequencing_2012.pdf) (staženo dne 18.3.2013)