

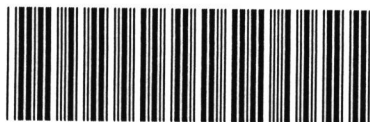
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra pěstivařství



Studijní program: Zemědělství B4131
Studijní obor: Zemědělská biotechnologie
Specializace: Živočišná biotechnologie

Identifikace *fad 3* genu u řepky

Knihovna JU - ZF



3114700327

Vedoucí bakalářské práce:
Doc.Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor:
Václava Žaludová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra pěstivařství
Akademický rok: 2004/2005

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Václava ŽALUDOVÁ**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**

Název tématu: **Identifikace FAD3 genu u řepky**

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 ověření možnosti použití molekulárního selekčního markeru v programu šlechtění řepky. Budou hledány vhodné markery pro markerování znaku obsahu mastných kyselin u řepky. Literární přehled: zhodnocení významu molekulárních markerů pro účely popisu a identifikace genotypů, ve šlechtění a semenářství
Materiál a metody: popis metodiky PCR, PCR-RFLP analýzy, charakteristika studovaných linií a odrůd
Výsledky: vyhodnocení primárních elektroforetických dat, uspořádání do tabulek a grafů, databáze spekter
Diskuse: porovnání vlastních výsledků s literárními údaji , posouzení možnosti 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 práce: 40-50
Rozsah příloh: 5-10
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Hoelzel A.R. (1992): Molecular Genetic Analysis of Populations. - IRL Press at Oxford Univ. Press, New York.

Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley & Sons, Inc., New York.

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

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
Katedra pícninářství

Datum zadání bakalářské práce: **5. března 2005**

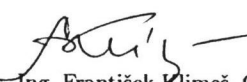
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2006**

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


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka

L.S.


doc. Ing. František Klimeš, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 5. března 2005

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

V Českých Budějovicích 20. dubna 2006

Kateřina Záludová

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

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Řepka olejka.....	2
2.2. Složení řepkového oleje a jeho využití.....	2
2.2.1. Složení řepkového oleje z hlediska historického vývoje odrůd.....	2
2.2.2. Využití řepky v potravinářském průmyslu.....	4
2.2.3. Využití řepky pro nepotravinářské účely.....	4
2.3. Šlechtění řepky a tvorba hybridních odrůd.....	5
2.3.1. Cytoplazmatická samčí sterilita.....	5
2.3.1. INRA ogura.....	6
2.3.3. Systém MSL.....	6
2.3.4. Polima.....	6
2.2.5 Autoinkompatibilita.....	7
2.4. Metody detekce DNA polymorfismu.....	8
2.4.1. Techniky založené na PCR reakce.....	9
2.4.1.1. RAPD - (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismu náhodně amplifikované DNA).....	9
2.4.1.2. SPLAT technika.....	9
2.4.1.3. AFLP technik.....	9
2.4.1.4. Sekvenování.....	10
2.4.2. Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR reakce.....	10
2.4.2.1. RFLP (restriction fragment length polymorfism - délka polymorfismu restrikčních fragmentů).....	10

2.4.2.2. VNTR (Variability of Number Length Polymorphism – variabilita počtu tandemových repetic).....	11
2.5. Klonování.....	11
2.5.1. Klonovací vektory.....	12
2.5.2. Příprava rekombinantní molekuly DNA.....	12
2.5.3. Přenos rekombinantní molekuly do hostitelské molekuly DNA	13
2.2.4. Selektce klonů obsahující rekombinantní DNA	13
2.6. Sekvenování DNA.....	13
2.6.1. Chemické sekvenování DNA (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování).....	13
2.6.2. Enzymatické sekvenování DNA (Sangerovo sekvenování).....	14
2.6.2.1. Automatické sekvenování DNA.....	15
2.7. Biosyntéza mastných kyselin.....	16
2.8. Molekulární markery používané ve šlechtění řepky.....	17
2.8.1. Biosyntéza kyseliny linolenové.....	17
2.8.2. Genetické založení obsahu mastných kyselin.....	17
2.8.2.1. Heritabilita znaku a vliv prostředí.....	17
2.8.3. Linie se sníženým obsahem k. linolenové	18
2.8.3.1. Charakteristika genů pro desaturázy.....	18
2.8.3.2. Vliv teploty na obsah k. linolové a linolenové.....	19
2.9. Molekulární markery pro snížený obsah k. linolenové.....	19
3. Materiál a metody.....	21
3. 1. Rostlinný materiál.....	21
3.1.1. Složení mastných kyselin v semeni.....	21
3.2. Metody	21
3.2.1. RAPD.....	21

3.2.2. Klonování a sekvenování cDNA alel genu <i>fad 3</i>	22
3.3. Izolace celkové RNA z rostlinných buněk pomocí RNeasy Plant Mini Kit – QIAGEN.....	23
3.4. Izolace mRNA pomocí Oligotex mRNA kit – QIAGEN.....	24
3.5. Reverzní transkripce (Omniscrypt Reverse Transcription – QIAGEN).....	24
3.6. RT - PCR.....	25
3.7. Klonování – pomocí QIAGEN PCR Cloning Kit	25
3.8. Restrikční štěpení pomocí Eco RI.....	27
3.9. Elektroforetická separace.....	28
3.10. Sekvenační reakce (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit - Beckman Coulter).....	28
3.11. Přechištění sekvenační reakce.....	28
4. Výsledky.....	29
5. Diskuse.....	32
6. Závěr.....	33
7. Přehled použité literatury.....	34
8. Použité zkratky	38

1. ÚVOD

Řepka olejka patří k významným plodinám pěstovaným v České republice. Její vysoké zastoupení na osevních plochách je zejména způsobeno její ekonomickou rentabilitou v porovnání s jinými plodinami. Tvoří 90 % ze všech u nás pěstovaných olejnin, a pěstuje se především její ozimá forma. Většina produkce řepky má uplatnění v potravinářském průmyslu. Přechod na nové odrůdy bez kyseliny erukové, a sníženým obsahem glukosinulátů vedl k tomu, že řepkový olej se stal konkurence schopným slunečnicovým, sojovým a palmovým olejům. Jedním ze šlechtitelských cílů při vytváření nových odrůd je snížení obsahu kyseliny linolenové v oleji. Kyselina linolenová díky třem dvojným vazbám snadno oxiduje a zhoršuje tak sensorické vlastnosti oleje a jeho skladovatelnost. Selektce rostlin při šlechtění na nízký obsah k. linolenové podle fenotypu je zdlouhavá, a málo účinná. Cílem této práce je přispět k vytvoření molekulárního markeru, který by účinně selektoval rostliny s nízkým obsahem k. linolenové v rané fázi ontogeneze. Využívání molekulárních markerů ve šlechtění je v současné době nejefektivnější postup, jak získat co nejrychleji novou odrůdu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Řepka olejka

Řepka olejka (*Brassica napus L. var. napus*) je amphiallotetraploid s 38 chromozomy. Původní výskyt je vázán na oblast středomoří, kde se také vyskytuje *Brassica oleracea L.* (brukev zelná) a *Brassica campestris* (řepice olejná). Křížením těchto druhů s diploidním počtem chromozomů 18 resp. 20 vznikla řepka olejka s 38 chromozomy. Ozimý typ řepky je méně rozšířen než její jarní forma. Zahrnuje především oblast střední a západní Evropy, Skandinávií, Kanadu, ale také Ukrajinu (Hosnedl et al., 1998).

2.2. Složení řepkového oleje a jeho využití

2.2.1. Složení řepkového oleje z hlediska historického vývoje odrůd

Olejniny patří v České Republice k ceněným plodinám výrazně diverzifikující možnosti zemědělských podniků ve smyslu pěstování pestré skladby rostlinných druhů. Řada z nich patří ke zlepšujícím plodinám, a působí tak jako přerušovače obilných sledů, často přetížených obilninami. Mezi u nás pěstovanými olejinami má zcela mimořádné postavení řepka olejka (Baranyk, 2005). Počátky šlechtění řepky v Československu se datují do období první republiky. Význam řepky byl v té době jen velmi malý. Výběrem domácích krajových odrůd vznikly ozimé řepky Třebíčská krajová, Slapská a jarní řepka Česká krajová, které obsahovaly cca 50% kyseliny erukové (KE), a glukosinulátů (GSL), (Vašák et al., 1997). Dnes jsou žádány především řepky typů HO s 80% obsahem kyseliny olejové, hybridné řepky které mají o 15 – 20% vyšší výnos, a řepky využívající se v nepotravinářských odvětvích.

Tab. 1: Klasifikace typů řepky (upraveno dle Vašák a kol., 1997)

Typ	Vlastnosti	Typ šlechtění, cíl	Příklady odrůd
“EG“	Klasická řepka KE - 41-54 %, GLS 90-110 mmol/semene	Klasické šlechtění, již se nepěstují. Řepka s výnosovou stabilitou i výnosem, ovšem pro technické využití.	Udržován v gen. bance

“O“	Bezeruková řepka KE- do 2 %, GLS 90 - 110 mmol/g semene	Klasické šlechtění. Řepka s výnosovou stabilitou i výnosem a kvalitou pro potravinářské využití	Jet Neuf (F), Silesia (ČR), již nepěstovány
“00“	Dvounulová řepka, KE - do 2%, GSL do 25 mmol/g semene	Klasické šlechtění, řepky s výnosovou stabilitou i výnosem. Kvalita pro potravinářské i krmivářské využití.	Lirajet (D), Falcon (D), Zorro (D), Olymp (D), Stela (ČR)
“EO“	Řepka s vysokým obsahem KE - 41 - 54%	Klasické šlechtění. Kvalita vhodná pro technické a krmivářské využití	Oáza (ČR), Erox (D)
“000“	Žlutosemenná řepka. Kvalita jako “00“ řepka- navíc snížený obsah vlákniny z 12 % na 6%	Klasické šlechtění. Kvalita vhodná pro potravinářské využití a zlepšené krmivářské vlastnosti.	Ozimá řepka prozatím není k dispozici, všechny současné “00“ řepky odslupkované
“0000“	Kvalita jako u “000“ + snížený obsah kyseliny linolenové	Klasické šlechtění. Zlepšená kvalita pro potravinářské využití.	CADDY (F)
“HO“	Kvalita jako u “00“ řepek, ovšem s vysokým obsahem kys. olejové (nad 80%)	Klasické šlechtění Příp. genové technologie. Speciální využití v potrav. I nepotrav. sektoru.	Hola typ (D)
Trierucin	Kvalita jako u “00“ řepek ovšem KE nad 70%	Genové technologie.- nepotravinářské využití	Doposud pouze v Kanadě a USA
Stearin	Kvalita jako u “00“ řepek ovšem s obsahem kyseliny stearové cca 30%	Genové technologie - nepotravinářské využití	Doposud pouze v Kanadě a USA
Laurin	Řepka s obsahem kys. laurové nad 40%	Genové technologie - nepotrav. využití	Doposud pouze v Kanadě a USA
Hybridní řepka	Řepka s “00“ a výnosem vyšším o 15 - 20%	Hybridní šlechtění. Kvalita pro potrav. využití	Pronto+ (RH - D), Betty (CHL - D) Synergy+ (CHL - F), Artus (RH - D)

KE = kyselina eruková, GSL = glukosinoláty, +RH = restaurovaný hybrid, CHL = kompozitní (složený) hybrid, D - německo, F - Francie

2.2.2. Využití řepky v potravinářském průmyslu

Pro potravinářské účely jsou významné především bezerukové odrůdy se sníženým obsahem glukosinulátů, poskytující oleje s vysokou nutriční hodnotou. Olej těchto odrůd se skladbou svých složek vyrovná olejům jako je sojový, a slunečnicový. Díky nízkému obsahu nasycených mastných kyselin, a vysokému obsahu mononenasycené kyseliny olejové, a esenciální kyseliny alfa-linolenové, patří řepkový olej z dietologického hlediska k nejcennějším jedlým olejům (Baranyk, 2000). Nenasycenou mastnou kyselinou je také kyselina linolová, která je velmi významnou složkou oleje. Je součástí vitamínu F, který má příznivé účinky na funkci krevního oběhu, snižuje cholesterol, a možnost výskytu kardiovaskulárních chorob (Hosnedl et al., 1998). V současné době tvoří řepkový olej cca 80 - 85 % všech zpracovávaných olejů v České republice. Používá se pro výrobu ztužených tuků, margarínů, ale také jako jednodruhový stolní olej, v tukařském a olejářském průmyslu. Ve směsi s palmoleinem vykazuje dobrou stabilitu, a proto se uplatňuje jako fritovací olej, který je odolný k opakovanému tepelnému namáhání. V kombinaci s palmovým olejem slouží, jako speciální náplňový tuk pro čokoládovnický a pečivářský průmysl.

2.2.3. Využití řepky pro nepotravinářské účely

Vedlejší produkty po vylisování řepkového oleje tzv. řepkové výlisky a šroty jsou používány v oleochemii. V tomto chemickém odvětví se z nich vyrábí glycerol, který je složkou pro mnoho produktů farmaceutického a kosmetického průmyslu. Mastné kyseliny vznikající rozkladem olejů, a tuků jsou využity při výrobě antistatik, detergentů, a vonné pryskyřice. Metylestery mastných kyselin řepkového oleje (tzv. čistá bionafta) jsou alternativním palivem do vznětových motorů, které není třeba konstrukčně upravovat. Mezi přednosti bionafty patří velmi dobrá biologická rozložitelnost. Nově (Holas a Souček, 1999) se zkouší uplatnění etylesteru řepkového oleje. Místo metanolu se pro esterifikaci užívá líh – bioetanol. Rostoucí tlak na ochranu životního prostředí vyústil do zavedení výroby maziv na bázi řepkového oleje. Hlavní předností těchto tzv. bioolejů je velmi dobrá biologická rozložitelnost. Postupně nahrazují v technicky zdůvodněných oblastech tradiční ropná maziva. V ČR se vyrábějí biooleje pro mazání řetězů motorových pil, pro hydraulické systémy, ztrátové mazání stacionárních pil, mazání podvozků železničních vozidel, výhybek v kolejové dopravě, pro užití v potravinářském průmyslu apod.

Největším výrobcem je SETUZA Ústí n. L., a.s., která dodává biooleje v širokém spektru použití. Oblast zpracování rostlinných olejů, za účelem použití ve farmaceutickém průmyslu, nebo při výrobě umělých vláken, emulgátorů, a detergentů se nazývá oleochemie (Fábry a kol., 1992). V krmivářském průmyslu se významně uplatňují odrůdy řepky se sníženým obsahem antinutričních faktorů – glukosinulátů, sinapinu, taninu, a kyseliny fytové. Které jsou vhodné jak pro zkrmování na zeleno, tak pro výrobu konzervovaných krmiv.

2.3. Šlechtění řepky a tvorba hybridních odrůd

Ruční křížení u řepky bylo prováděno přibližně již před 20 lety. Výsledky ukázaly možnost zlepšení vlastností, při využití heteroze v porovnání hybridů s jejich rodiči, ale také v porovnání s nejlepšími liniovými odrůdami. Avšak řepka je ze 70% samosprašná a oboupohlavný květ neumožňuje mechanickou kastraci. Z tohoto důvodu se začalo ve světě pracovat na projektech, jejichž cílem bylo vyvinout metodu pro cizosprašení. Byly to postupy využívající mezidruhové křížení, fúzi protoplastů, a v poslední době také genové technologie (Paulmann, 1999). Všechny systémy výroby hybridního osiva jsou založeny na ustálení pylově-sterilní linie, která slouží jako mateřský komponent. V molekulárních systémech vzniká v důsledku přerušení vývoje mikrospor nebo tkání, které podporují jejich vývoj. Teoreticky lze také produkovat plně funkční pylová zrna, která však nejsou šířena do okolí v důsledku poškození struktury prašníků. Analogicky mohou být také vyvinuty metody, které vytvářejí samčí sterilitu (Arnison, 1997). Pro pěstitele jsou hybridní odrůdy atraktivní zejména z hlediska vysokých výnosů, odolnosti proti chorobám a také agrotechniky. Výroba hybridních odrůd je dnes založena na využití CMS (cytoplazmatické samčí sterilitě), nebo saprofytické autoinkompatibilitě (AI)

2.3.1. Cytoplazmatická samčí sterilita

Samčí sterilita zahrnuje cytoplazmatickou (Cytoplasmic Male Sterility, CMS) a genovou (Genetic Male Sterility, GMS) sterilitu. Předností CMS je, že výroba sterilní populace je ekonomicky rentabilní. Systém vyžaduje tři sterilní linie, jejichž vyšlechtění trvá řadu let, a sterilní cytoplazma může mít negativní vliv na výnos, a také na adaptaci rostliny v prostředí. Pro GMS jsou potřebné pouze dvě jakékoliv linie, které usnadňující nalézt kombinaci se silnou heterozí. Nevyskytuje se zde negativní vliv cytoplazmy na výnos, a také šlechtitelský cyklus je kratší. Markantní nedostatek je, ale v tom, že není možné zajistit sterilitu celé

populace, neboť se v ní vyskytuje vždy cca 50% fertálních rostlin, které je třeba z mateřských linií odstranit (Tu et al., 1999). Mnoho systémů využívajících CMS nebo GMS je založeno na mutaci mitochondrií, což vede k selhání vývoje funkčních pylových zrn, nebo prašníků.

2.3.2. INRA ogura

Cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) „Ogura“, byla z ředkve do řepky olejné přenesena organizací INRA ve Francii (Pelletier et al., 1983, 1987). Systém OGU-INRA CMS se vyznačuje dobrou stabilitou jak po genetické stránce tak také v adaptibilitě na přírodní podmínky. Zlepšení samčí fertility restaurující linie vedla k Rt liniím, s dobrou produktivitou a stabilním chováním při meióze (Delourme, Eber, Renard, 1991) tímto systémem lze vyrobit jak sdružené odrůdy, tak i restaurované hybridy. Sdružené odrůdy jsou hybridní odrůdy s pylovou sterilitou, k nimž je přimíchán určitý podíl fertálních rostlin sloužících pro opylení sterilní složky. Z důvodu cizosprašení je tento proces velmi závislý na počasí v době kvetení, perspektivní jsou tyto odrůdy zejména v oblasti jihozápadní Francie a Anglie. Vytvořené restaurující linie nemají doposud vyhovující kvalitu v oblasti glukosinulátů.

2.3.3. Systém MSL

Systém MSL (Male Sterility Lembke) je založen na spontánní mutaci, nalezené ve školkách firmy NPZ v roce 1982. Tento systém umožňuje vyrábět plně restaurované hybridy řepky bez ztrát na výnosech nebo kvalitě. První registrace těchto hybridů byla v roce 1995 v Německu. MSL systém nachází své uplatnění ve šlechtění ozimé řepky v Evropě, a jarní řepky v severní Americe (Paulmann, 1999). Skládá se ze tří komponent: sterilní mateřské linie, fertálního udržovatele sterility, a obnovitele pylové fertility.

2.3.4. Polima

Hybridní systém Polima CMS byl objeven v Číně. Jedná se o sterilitu, která se přirozeně vyskytuje v polské odrůdě jarní řepky Polima. Při vyšší teplotě vzduchu zůstávají rostliny fertální. Tento fakt značně komplikuje genetický výzkum sterility a nalezení udržovatelů sterility (Baranyk, 2005). Na bázi Polima CMS vznikly úspěšně hybridy v řadě šlechtitelských programů. Zvýšený obsah glukosinulátů není spojen s obnovením fertility,

kříženci, ale mohou poskytovat nižší výnos oleje. Nestabilita Polimy systému je také ovlivněna přírodním prostředím. Pokud k ní dojde, v důsledku samosprašení vznikne nehybridní osivo.

2.2.5 Autoinkompatibilita

Autoinkompatibilita (self-incompatibile, SI), je neschopnost rostlin opylit sebe sama. Používá se při výrobě hybridního osiva, ale problémy mohou nastat při rozmnožování, vlivem různých stresů může dojít k jejímu zhroucení, co vede k následnému znečištění hybridního osiva vlivem samosprašení. Přirozený výskyt SI rostlin u řepky je velmi nízký, aktivní S alely ovlivňují vysoký a stálý stupeň SI, mohou však být do genomu *Brassica napus* přeneseny pomocí resyntézy původních druhů *Brassica oleracea* a *Brassica rapa*. *Brassica oleracea* a *Brassica rapa* disponují efektivním AI systémem, zatím co allotetraploid *Brassica napus*, jež je u nich vývoj odvozen, a je autofertilní. AI může být využita jako mechanismus kontrolující opylování při výrobě hybridního osiva. Pro překonání AI je při množení inbredních linií je známo několik metod. První experimentální hybridy na bázi AI vykazaly výnos jako nejlepší odrůdy nebo ještě o 20 % vyšší (Ecke, Uzunova, Weißleder, 1995).

2.4. Metody detekce DNA polymorfismu

Zavedení techniky PCR, a její rychlý rozvoj výrazně zjednodušil řadu postupů používaných v molekulární biologii. PCR může být použita, i k náhodnému testování variability sekvencí v rámci genomu. Použitím krátkých náhodných primerů (cca 10bp), lze získat v relativně krátkém čase spektrum amplifikačních produktů, které se liší svojí délkou. Získané spektrum je obvykle polymorfní v rámci dané populace (RAPD's), a různá spektra získaná na základě amplifikační reakce za použití různých primerů vytváří detailní „fingerprinting“ DNA. PCR fingerprinting, využívá krátkých náhodných primerů se stává analogií klasického DNA fingerprintingu. Metoda PCR (polymerase chain reaction) napodobuje v laboratoři proces množení DNA, který je běžný u mnoha organismů v přírodě. Poprvé byla použita v roce 1984 (Saiki et al., 1988). Její podstatou je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' - OH konce směřují proti sobě. Jako primery se obvykle používají dva krátké oligonukleotidy o délce zhruba 18 – 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů začne probíhat syntéza nových řetězců, na obou matricových řetězcích protisměrně (Rosypal a kol., 2002). Při syntéze DNA se používají termostabilní *Taq* – polymerázy, které jsou vyizolovány z *Thermus aquaticus*. Tato bakterie byla poprvé objevena v Yellowstonském národním parku, resp. v horkých vřidelních pramenech. Životní podmínky podmínily její termostabilní vlastnosti, tzn. odolávat teplotám při niž DNA opakovaně denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů, při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají následující kroky:

- denaturace dvouřetězcové molekuly DNA (94 – 98°C)
- annealing - nasednutí primerů k odděleným DNA - řetězcům (30 -65°C)
- nasednutí DNA, RNA polymerázy (65 – 75°C)

Reakce probíhá v termocycleru, který má automaticky naprogramované teplotní cykly a intervaly. Teplotní hodnoty a doba trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů. Produkty PCR se reakce se hromadí teoreticky geometrickou řadou. Po 30 – 50 cyklech je ve vzorku přítomna v podstatě jen amplifikovaná DNA, kterou lze elektroforeticky detekovat. Výsledným produktem reakce

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

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

Využití PCR metody nahrazuje používání genových knihoven, zjednodušuje klonování genů, umožňuje detekci patogenů, transgenů, a amplifikaci DNA z celého genomu.

2.4.1. Techniky založené na PCR reakci

2.4.1.1. RAPD - (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismu náhodně amplifikované DNA)

Tato metoda patří mezi modifikované PCR techniky. Používá se k detekci polymorfismu v DNA, při níž je používán jediný krátký oligonukleotidový primer (např. hexanukleotid s náhodně zvolenou sekvencí), který se na cílovou DNA váže v náhodných místech (Rosypal, 2002). Libovolná sekvence obchází nevýhodu PCR techniky, u které je nutná znalost cílových sekvencí DNA fragmentů. Výsledkem RAPD je soubor ampliconů představující otisk DNA charakteristický pro daný organismus.

2.4.1.2. SPLAT technika

SPLAT (Specific Polymorphic locus Amplification Test – Amplifikace specifických polymorfních lokusů)

2.4.1.3. AFLP technika

AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism – polymorfismus amplifikovaných fragmentů)

2.4.1.4. Sekvenování

Tato metoda je nejpřesnější, avšak pracovně nejnáročnější, a nejdražším způsobem získávání DNA, při které se určuje přesné pořadí bází v určitém úseku DNA. Nejčastěji se používá Sangerova metoda. Sekvenovaný úsek DNA, např. klonovaný fragment nebo produkt polymerázové řetězové reakce se rozdělí do čtyř alikvótů, do každého z nich se přidají všechny čtyři volné deoxynukleotidy, a kromě toho jejich dideoxy formy ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP, kterým chybí 3' - OH skupina. Reakci enzymaticky zajišťuje některá z DNA polymeráz (Řehout, 2000).

2.4.2. Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR reakce

2.4.2.1. RFLP (restriction fragment length polymorfism - délka polymorfismu restrikčních fragmentů)

RFLP je metoda používaná v molekulární biologii, sledující jednotlivé sekvence DNA. Restrikční analýza DNA je metodou charakterizace DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleasami na fragmenty. 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 chromozómu (Rosypal, 2002). Identifikace a analýza produktů štěpení, se provádí elektroforetickým dělením a hybridizací se specifickou sondou (Southernova hybridizace). Mutace v restrikčním místě změni velikost restrikčních fragmentů, a tedy i velikost proužků po hybridizaci. Je známo velké množství bakteriálních restrikčních endonukleas (asi 1500), které se liší od sebe tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů - 4, 6, 8 a že štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bází a podle rozpoznané sekvence. Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restrikčních fragmentů o určité opět reprodukovatelné délce (= počtu bází). Počet i délka fragmentů je pro daného jedince specifická. Některé restrikční endonukleasy jsou citlivé na metylaci DNA. V některých případech methylace adeninu a methylace cytosinu inhibují štěpení, v jiných je methylace pro štěpení nezbytná. Odlišení různých DNA se provádí na základě polymorfismu délky štěpných úseků. Tento polymorfismus vzniká na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst. Obecně restrikční endonukleasy, které rozpoznávají kratší sekvence, štěpí DNA častěji na menší úseky, zatímco restrikční endonukleasy rozpoznávající

delší sekvenci štěpí méně často a na delší fragmenty. Při neúplném (parciálním) štěpení DNA vlivem nevhodných reakčních podmínek vznikají delší úseky (například velký obsah bílkovin, nevhodná teplota, nedostatečná doba). Hvězdičkové štěpení (tzv. "star" aktivita enzymu) je způsobeno nespecifickým štěpením mimo rozpoznávací místa. Vzniká tak mnoho krátkých úseků. Tento analyticky nepříznivý stav může být způsoben například nadbytkem glycerolu v reakci. Proto nelze zvyšovat koncentraci restričního enzymu v reakci zvyšováním použitého objemu, ale použitím stejného objemu enzymu ze zásoby o vyšší koncentraci. Tato metoda se často používá při určování otcovství, nebo pro identifikaci DNA v kriminalistice. Další využití je např. při identifikaci chorob různých jedinců, nebo k identifikaci rozsahu rekombinací, které mohou vést ke genetické mapě, a určovat vzdálenost lokusů v cM.

2.4.2.2. VNTR (Variability of Number Length Polymorphism – variabilita počtu tandemových repetice)

Technika DNA fingerprintingu, využívá krátké nespecifické sondy, které detekují polymorfismus na úrovni středně repetitivních sekvencí – tzv. minisatelitu (jsou tvořeny opakovanými úseky sekvencí dlouhých 10 – 60 párů bazí). Tyto minisatelity se s největší pravděpodobností vyskytují v různých pozicích v celém eukaryontním genomu. Počet opakování určitého minisatelitu může u jedinců jedné populace kolísat (VNTR), a tato variabilita je detekována jako variabilita délky restričních fragmentů po štěpení restričními enzymy, které štěpí v rámci sekvencí dané repetice. Nejvýznamnější aplikace analýzy je v oblasti rostlinné evoluce.

2.5. Klonování

Klonování je metoda molekulární biologie vedoucí k tvorbě klonů. Klon je soubor identických buněk (organismů), odvozených ze společného předka mitózou u eukaryot, a prostým dělením u prokaryot. DNA klon je soubor identických molekul, fragmentů, nebo úseků DNA, připravených např. množением rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (in vivo) nebo polymerázovou řetězovou reakcí in vitro. Rekombinantní molekula DNA je molekula DNA vytvořená in vitro, spojením cizorodé DNA s klonovacím vektorem (molekula DNA, která schopnost přijmout cizorodou DNA, spojit se s ní, a následně replikovat v hostitelské buňce). Cizorodá DNA (též inzert) je libovolný úsek DNA vložený do klonovacího vektoru. Hlavní předností klonování je, že umožňuje izolovat z genomu jeho

dílčí úseky, a ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně zmnožit (Šmarda a kol., 2005). Oblasti, ve kterých se využívá klonování jsou např. studium, a funkce genů, studium regulačních oblastí řídících expresi genů, fyzikální a genetická analýza genomu (Rosypal, 2002). Tento proces zahrnuje tři základní kroky:

- příprava rekombinantní molekuly DNA
- přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky
- selekce klonů obsahující rekombinantní DNA

2.5.1. Klonovací vektory

Jako klonovací vektory jsou nejčastěji používány kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace, odvozené z plazmidů nebo virů. Plazmidové vektory jsou vektory s velikostí (2–15 kb), účinnost přenosu plazmidové DNA je nepřímo úměrná její velikosti, malé plazmidy se snadno izolují, a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií. Mají vysokou schopnost udržení cizorodé DNA, při replikaci a uchování klonů, snadný a účinný přenos do hostitelské buňky. Mezi další požadavky patří, že musí obsahovat gen (označovaný také jako selekční marker). Na základě fenotypového projevu tohoto genu (např. gen pro rezistenci k antibiotikům), lze buňky nesoucí tento plazmid selektovat.

2.5.2. Příprava rekombinantní molekuly DNA

Jako rekombinantní molekulu lze použít genomovou DNA izolovanou z donorového organismu, cDNA připravenou zpětnou transkripcí z mRNA, a nebo DNA připravenou chemickou syntézou. Aby mohly být tyto rekombinantní molekuly začleněny do vektoru musí být speciálně upraveny. Genomová DNA se nejprve štěpí restriktaázou nebo mechanickým sestříhem na kratší fragmenty, tak aby vznikla vzájemná komplementarita mezi inzertní a vektorovou DNA. K přípravě cDNA se používá přečištěná mRNA, vzniklá zpětnou transkripcí DNA. DNA syntetizovaná uměle, tedy chemickou cestou se připravuje postupným spojováním kratších dvouřetězcových úseků, vytvořených ze vzájemně komplementárních oligonukleotidů. Celková délka může pak dosáhnout několika stovek párů bazí a obsahovat sekvenci komplementárního genu.

2.5.3. Přenos rekombinantní molekuly do hostitelské molekuly DNA

Často používaným hostitelem plazmidových vektorů jsou buňky kmenů *E. coli*. Přenos lze provést několika způsoby. Mezi nejčastější patří transformace, při níž jsou Bakteriální buňky vystaveny působení chloridu vápenatého, a vyhladověním za chladu do stavu kompetence, v němž jsou schopny přijmout exogenní DNA. Elektroporace je metoda při níž se buňky v roztoku obsahující rekombinantní DNA krátkému elektrickému impulsu o vysokém napětí. Tím dojde u buňky k vytvoření pórů, kterými prochází exogenní DNA a vstupuje tak do buněk.

2.2.4. Selekcce klonů obsahující rekombinantní DNA

Po přenosu plazmidových molekul do hostitelské buňky je třeba identifikovat buňky, které obsahují rekombinantní plazmidy, a odlišit je od buněk, které tyto plazmidy nemají. Restrikční analýza DNA je metoda, která využívá na štěpení rekombinantní DNA restrikční endonukleázu. Po štěpení rekombinantní DNA restrikční endonukleázou použitou k začlenění cizorodé DNA do vektoru se cizorodá DNA z vektoru vyštěpí, a následně jí můžeme prokázat pomocí elektroforézy.

2.6. Sekvenování DNA

Cílem sekvenování DNA je stanovení její primární struktury. Základem je získat molekuly DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji používaný výchozí materiál pro sekvenování DNA jsou restrikční fragmenty klonované do vhodného klonovacího vektoru nebo fragmenty získané pomocí PCR. K detekci primární struktury lze použít dvě metody, a to enzymatickou, a chemickou.

2.6.1. Chemické sekvenování DNA (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)

Podstatou chemické metody sekvenování je specifické štěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech bází určitého typu (Rosypal, 2002). Jako výchozí materiál se používá identické fragmenty jednořetězcové DNA, které jsou na jednom konci radioaktivně

označeny. Postup této metody je, že si připravíme značené jednořetězcové fragmenty. Ty jsou následně rozděleny do čtyř vzorků. Na každý vzorek působíme chemickou látkou, která specificky modifikuje jeden nebo dva typy bází. Působením další chemické látky se štěpí DNA-řetězce ve všech místech, v nichž byly báze modifikovány. Výsledek štěpení molekul v daném vzorku je pak soubor fragmentů DNA různých délek, které odpovídají vzdálenosti bází příslušného typu od značeného konce výchozí molekuly DNA. Fragmenty DNA se rozdělí pomocí elektroforézy na denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Detekce fragmentů se provede autoradiograficky, po jejich přenosu na nitrocelulózový filtr. Sekvence DNA se stanoví pomocí autoradiogramu odečtením poloh pruhů v jednotlivých drahách gelu.

2.6.2. Enzymatické sekvenování DNA (Sangerovo sekvenování)

Při této metodě je DNA použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky pomocí DNA – polymerázy (Rosypal, 2002). Syntéza komplementárních řetězců k matricové DNA se zahájí z místa, ke kterému je připojen sekvenčně specifický primer, a ukončí se v místě, ve kterém se do rostoucího řetězce včlení místo normálního deoxyribonukleozidtrifosfátu jeho analog dideoxynukleozidtrifosfát (ddNTP). Tento analog působí po začlenění do řetězce jako koncový inhibitor syntézy DNA, jelikož DNA – polymeráza k němu nemůže v důsledku nepřítomnosti 3'OH skupiny připojit další nukleotid. Pokud zvolíme vhodný poměr nukleotidů, a jejich analogů v reakční směsi bude výsledkem reakce soubor řetězců s různou délkou, zakončený v náhodných místech do nichž se začlenily dideoxynukleotidy. Postup této metody je, že se výchozí materiál rozdělí do čtyřech oddělených vzorků. Každý vzorek obsahuje:

- molekulu DNA jejíž sekvence má být stanovena
- primer (krátké restriční fragmenty nebo synteticky připravené oligonukleotidy, o délce zhruba 18 komplementárních bází k části molekuly DNA jejíž sekvence se stanovuje), který se připojí k části molekuly DNA nebo k místu připojení na vektoru
- směs, která obsahuje čtyři normální nukleotidy, z nichž jeden je radioaktivně označen
- DNA - polymerázu

Po proběhnutí polymerizační reakce se vytvořené produkty zdenaturují, a rozdělí se na polyakrylamidovém denaturujícím gelu. Sekvence odečteme s autoradiogramu.

2.6.2.1. Automatické sekvenování DNA

Sekvence jsou z gelu odečítány a vyhodnocovány automaticky. Odlišnosti proti standardním metodám:

- syntéza DNA probíhá metodou asymetrické PCR v termocycleru s využitím *Taq* - *polymerázy*
- ke značení reakčních produktů se používá neradioaktivně označené primery nebo dideoxynukleotidy
- detekce produktů sekvenačních reakcí probíhá v průběhu elektroforetické separace automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na počítač, který z pořadí pruhů v příslušných drahách vyhodnocuje přímo sekvenci DNA

Vyhodnocení sekvenačních dat

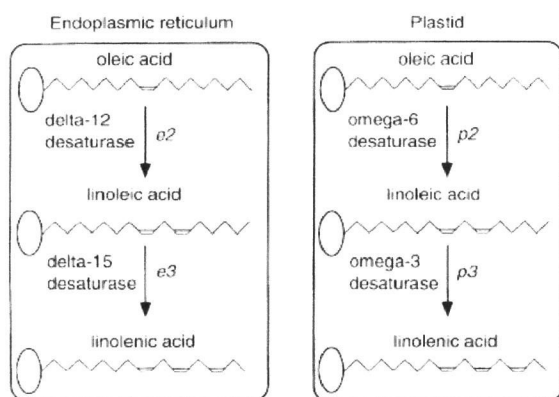
Používá se speciálních počítačových programů, vedoucích ke komplexní analýze. K ní patří:

- vyhledávání rozpoznávacích míst pro restrikční enzymy
- vyhledávání repetitivních sekvencí
- převádění sekvencí nukleotidů do sekvence aminokyselin, vyhledávání otevřených čtecích rámců, které mohou být potenciálními geny
- vyhledávání motivů charakteristických pro regulační oblast
- srovnání stanovené sekvence nukleotidů, nebo z ní odvozené sekvence aminokyselin se sekvencemi uloženými v databankách

2.7. Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin probíhá současně ve dvou organelách a to v endoplazmatickém retikulu, a plastidech. Obě tyto biosyntetické dráhy jsou navzájem propojeny. Z triacylglycerolů a zásobních tuků vzniká první meziprodukt pylmitoyl-acyl carrier protein. Poté je většina řetězců prodloužena, až na stearoyl-ACP. Enzym desaturáza vytvoří dvojnou vazbu a vznikne oleoyl-ACP (Browse a Somerville, 1991). Z oleoylu je syntetizován linoleoyl-fosfatidylcholinu (18:2-PC) a linolenoyl-fosfatidylcholinu (18:3-PC), které jsou syntetizovány pomocí specifických desaturáz. Z komplexu 18:3-PC jsou k. linolenová a cholin uvolněny fosfatázou (Miguel a Browse, 1992). Souběžně existují dvě desaturační cesty, které mají své odpovídající enzymy, a to v membránách endoplazmatického retikula a v plastidech (obr 1.), (Scheffler et al., 1997). Na základě biochemických důkazů se předpokládá, že enzymy z ER a plastidů se mohou lišit s ohledem na mechanismus, kterým vyhledávají místo budoucí dvojně vazby uvnitř řetězce acylu (Heinz, 1993).

Označení pro specifické desaturázy se liší podle místa působení. Vytvoření druhé dvojně vazby u 18:1 katalyzuje v ER δ -12, v plastidech pak ω -6 desaturáza. Třetí dvojná vazba a vznik 18:3 je umožněn pomocí δ -15 (ER) nebo ω -3 desaturázou (plastidy), (obr 1.). Tyto desaturázy jsou kódovány geny, které leží na jednom úseku chromozómu. Gen pro δ -15 desaturázu je označen jako *fad 3* (fatty acid desaturase) a pro ω -3 desaturázu se nazývá *fad 7* (Scheffler et al., 1997). V zelených částech rostlin je k. linolenová především syntetizována v plastidech (Lemiux et al., 1990).



Obr. 1. Zjednodušený diagram, který znázorňuje dvě biosyntetické dráhy vzniku mastných kyselin. Substrátem pro další dvě je kyselina olejová 18:1. Desaturáza endoplazmatického

retikula delta-12 (e2) nebo plastidů omega-6 (p2) katalyzuje vytvoření dvojné vazby v olejové kyselině navázané na lipid. Delta-15 (endoplasmatické retikulum, e3) a omega-3 (plastid, p3) katalyzuje vytvoření druhé dvojné vazby. V plastidech může být dalším možným substrátem pro omega-6 desaturázu kyselina delta-7 hexadecenová (16:1) a vznikají místo osmnáctiuhlíkatých MK šestnáctiuhlíkaté (Scheffler et al., 1997).

2.8. Molekulární markery používané ve šlechtění řepky

2.8.1. Biosyntéza kyseliny linolenové

Biosyntéza k. linolenové má několik mezikroků a probíhá hlavně v endoplasmatickém retikulu (ER) a také souběžně v plastidech, například v chloroplastech. Z triacylglycerolů a zásobních tuků vzniká první meziprodukt palmitoyl-acyl carrier protein (16:0-ACP). Většina řetězců je prodloužena na stearoyl-ACP (18:0-ACP). Potom enzym desaturáza, která je blíže příbuzná syntetáze mastných kyselin, vytvoří dvojnou vazbu a vznikne oleoyl-ACP (18:1-ACP) (Browse a Somerville, 1991). 18:1 jsou využívány k syntéze linoleoyl-fosfatidylcholinu (18:2-PC) a linolenoyl-fosfatidylcholinu (18:3-PC), které jsou syntetizovány pomocí specifických desaturáz. Z komplexu 18:3-PC jsou k. linolenová a cholin uvolněny fosfatázou (Miguel a Browse, 1992). Souběžně existují dvě desaturační cesty, které mají své odpovídající enzymy, a to v membránách endoplasmatického retikula a v plastidech (obr 1.), (Scheffler et al., 1997). Na základě biochemických důkazů se předpokládá, že enzymy z ER a plastidů se mohou lišit s ohledem na mechanismus, kterým vyhledávají místo budoucí dvojné vazby uvnitř řetězce acylu (Heinz, 1993).

2.8.2. Genetické založení obsahu mastných kyselin

2.8.2.1. Heritabilita znaku a vliv prostředí

Koncentrace k. linolenové je především určena genotypem embrya a interakcemi dvou až tří lokusů (Chen a Beversdorf, 1990). Podstata genetické regulace znaku je tedy složitá, je řízena matroklinně a ovlivňována teplotou (Pleines a Friedt, 1989). Obsah nenasycených mastných kyselin v membránách inverzně koreluje s růstem teploty. Ovlivňování různých mezikroků biosyntézy nenasycených MK může vést k významným změnám v přizpůsobování

buněčných membrán vysokým teplotám (Falcone et al., 2004). Je inverzně korelován se vzrůstající teplotou. Snížení obsahu 18:3 bylo prostou selekcí neproveditelné, protože neexistovala žádná významná a stabilní genetická variabilita pro tento znak u existujících genotypů plodin. Je to pochopitelné, když uvážíme, že 18:3 hraje nezbytnou úlohu ve fotosyntéze a kolísání její koncentrace v rozmezí od 6 až 12% je většinou způsobeno faktory prostředí (Thies, 1971). Prvního úspěchu dosáhli až Röbbelen a Nitsch, když se jim v roce 1975 podařilo chemickou mutagenézou vytvořit mutantní linii M11 z kanadské odrůdy Oro. Z této linie byla vytvořena selekcí odrůda jarní řepky Stellar s obsahem 18:3 3 %. Selektce podle fenotypu, který je značně ovlivňován prostředím byla zdlouhavá a ne příliš úspěšná, pokrokem bylo objasnění biosyntézy C 18:3 a využití molekulárních markerů.

2.8.3. Linie se sníženým obsahem k. linolenové

2.8.3.1. Charakteristika genů pro desaturázy

Označení pro specifické desaturázy se liší podle místa působení. Vytvoření druhé dvojné vazby u 18:1 katalyzuje v ER δ -12, v plastidech pak ω -6 desaturáza. Třetí dvojná vazba a vznik 18:3 je umožněn pomocí δ -15 (ER) nebo ω -3 desaturázou (plastidy) (obr 1.). Tyto desaturázy jsou kódovány geny, které leží na jednom úseku chromozómu. Gen pro δ -15 desaturázu je označen jako *fad 3* (fatty acid desaturase) a pro ω -3 desaturázu se nazývá *fad 7* (Scheffler et al., 1997). V zelených částech rostlin je k. linolenová především syntetizována v plastidech (Lemiux et al., 1990).

Odhaduje se, že *fad 3* i *fad 7* mají 6 až 8 kopií na haploidní genom. Duplikována je celá velká multigenní rodina desaturáz a zdá se, že je to výsledkem duplikace velkého úseku chromozómů než jednotlivých genů. Podle počtu kopií u *Brassica oleracea* a *Brassica rapa*, které jsou parentálními předky *B. napus*, se dá předpokládat, že duplikace vznikla již v těchto druzích ještě před vytvořením *B. napus* (Scheffler et al., 1997). Jeden z biotechnologických postupů je založen na specifické expresi buď sense, nebo antisense mRNA v semeni, aby byla ovlivněna produkce určitých desaturáz. Účinnost této metody záleží na různých faktorech a jedním z nich je počet kopií cílových endogenních genů. U *Brassica napus* byla transgenozí již několikrát upravena skladba mastných kyselin pro produkci MK, jako například k. laurinové, palmitové, stearové, olejové a také γ -linolenové (Thelen a Ohlrogge, 2002).

2.8.3.2. Vliv teploty na obsah k. linolové a linolenové

Enzymatická aktivita desaturázy *fad 2* v semenech je ovlivňována vysokou teplotou dvěma různými mechanismy s různým účinkem. Dlouhodobý přímý účinek je spojen s nízkou termální stabilitou enzymu, která vede k tepelné denaturaci enzymu. Tím je snížena aktivita enzymu a sníží se i obsah k. linolové a s ním také k. linolenové. Krátkodobý nepřímý účinek je spojen se sníženou dostupností O₂, která reverzibilně inaktivuje enzym, sníží se jeho aktivita a následně obsah k. linolové (Martínez-Rivas et al., 2004).

Vliv nízkých teplot na obsah nenasycených MK byl podrobně studován u přímořské trávy *Paspalum vaginatum*. Obsah kyseliny linolové se výrazně zvyšoval v průběhu působení nízkých teplot. Tolerance k chladu koreluje se stupněm nasycení MK v membráně. Nenasycené MK nejspíše pomáhají membránám udržet polotekutý stav nutný pro biologickou funkci (Cyril et al., 2002).

Kyselina linolenová hraje nezbytnou úlohu ve fotosyntéze a kolísání její koncentrace v rozmezí od 6 až 12% je většinou způsobeno faktory prostředí (Thies, 1971). Přesně vymezené množství nenasycených MK je vyžadováno pro fotosyntetickou termostabilitu při zvýšené teplotě. Změny ve složení MK membrány zapříčiněné teplotou jsou regulovány tak, aby dosáhly velmi podobné úrovně nasycení navzdory mutacím, které složení MK narušily (Falkone, 2004).

Z uvedených údajů vyplývá, že obsah nenasycených MK je v určitém rozmezí variabilní v závislosti na tepelných podmínkách, protože plní důležité biologické funkce v rostlině. V potenciální odrůdě se sníženým obsahem k. linolenové by se tento obsah měl také měnit, ale neměl by se výrazně zvýšit na hodnoty, které jsou v běžných odrůdách.

2.9. Molekulární markery pro snížený obsah k. linolenové

Metodou RAPD marker poměrně dobře segregující s fenotypem (25a) (Tanhuanpää et al., 1995). Popsaný je i RAPD marker K01-1100, který vykazoval významné rozdíly mezi nízkým a vysokým obsahem 18:3 u dvou F₂ populací. Pokud sloužil jako próba pro RFLP, segregoval kodominantně a rozlišil heterozygoty od homozygotů s mutantní alelou (Hu et al., 1995). V jiné studii K01-1100 vůbec polymorfni nebyl (Jourdren et al., 1996). Jourdren et al., (1996) určil dvě vazebné skupiny šesti markerů L1 a L2 (72,7 cM a 78,6 cM), z nichž každá odpovídala důležitému QTL a objasňovala 24 % a 30,7 % celkových odchylek od obsahu k. linolenové. V jiné studii bylo 27 RAPD markerů rozděleno do třech vazebných skupin, které

rovněž vykazovaly QTL pro k. linolenovou a dohromady představovaly 73,5 % variability v populaci. Blízko jednoho z QTL, představujícího 23,5 % odchylek, byl zmapován *fad3* (Tanhuanpää a Schulman, 2002). Kodominantní RAPD marker L1L9 byl použit pro vytvoření SCAR markeru (Sequence Characterized Amplified Region) a vykazoval přibližně 25 % genetické variability znaku. Podle vazebné analýzy tento marker zřejmě označuje gen pro ω -3 desaturázu (Hu et al., 1999).

3. MATERIÁL A METODY

3. 1. Rostlinný materiál

Pro hledání RAPD markeru byla použita F₂ populace rostlin štěpící v obsahu mastných kyselin, kterou poskytl Ing. Koprna z VÚOL Opava. K vytvoření této populace byly nakříženy dvě linie lišící se v obsahu mastných kyselin, linie BN-08 a OP 1006. Linie OP 1006 byla použita jako donor nízkého obsahu k. linolenové. Pro klonování a sekvenování genů pro desaturázy byly použity dvě linie s nízkým obsahem k. linolenové a dvě s běžným obsahem k. linolenové jako kontroly.

3.1.1. Složení mastných kyselin v semeni:

Linie s nízkým obsahem k. linolenové:

OP - 1006: 18:1 - 79,0 %, 18:2 – 11,3 %, 18:3 – 2,4 %

Kontrolní linie s normálním obsahem k. linolenové:

BN - 08: 18:1 - 66,3 %, 18:2 – 20,3 %, 18:3 – 9,38 %

3.2. Metody

3.2.1. RAPD

Skríning RAPD primerů byl proveden s 52 vybranými primery (Tanhuanpää et al., 1995; Somers et al., 1998) u rodičovských linií a F₁ generace. Jako templát byla použita genomická DNA, která byla izolována pomocí kitu (Qiagen DNasy Plant Mini Kit). K RAPD analýze bylo celkem použito 8 vybraných primerů (OPR 12, OPS 1, OPB 9, OPA 7, OPB 15, OPB 12, OPK 1, 25). Ty byly použity u 39 rostlin F₂ štěpící populace s různým obsahem k. linolenové. Segregující pruhy v populaci byly porovnány se skutečným obsahem k. linolenové stanoveným pomocí plynové chromatografie.

3.2.2. Klonování a sekvenování cDNA alel genu *fad 3*

Z děložních lístků byla izolována celková RNA (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen), ta byla reverzně transkribována (Omniscript RT Kit, Qiagen) na cDNA. Transkribovaná cDNA byla použita jako templát pro specifickou amplifikaci *fad 3* genu (Fourman et al., 2002). cDNA obsahující *fad 3* gen, byla amplifikována pomocí RT – PCR, se specifickými primery (forward a reverse), tyto primery slouží k amplifikaci určitého úseku DNA. Výsledek amplifikace byl vyhodnocen elektroforetickou separací na agarózovém gelu. Amplifikované fragmenty byly z gelu vyříznuty, a pomocí (JET quick Spin Column Technique) byl zpětně vyizolován PCR produkt. Tento produkt byl zaligován do pDrive cloning vector DNA, za přítomnosti 2 x Ligation Master Mix. Transformace kompletních QIAGEN EZ buněk. Buňky necháme rozmrazit na ledu. Při pokojové teplotě necháme vytemperovat SOC médium. K 5 μ l ligační směsi přidám k 17 μ l kompletní QIAGEN EZ buněk, jemně pomícháme špičkou, a necháme 5 minut inkubovat na ledu. Po proběhlé inkubaci, provedeme tepelný šok v termocycleru 42° C / 30 s. Inkubujeme 2 minuty na ledu. Přidáme 150 μ l SOC a inkubujeme v třepačce při 37°C / 200 rpm, po dobu 15 minut. Na Petriho misky s pevným LB médiem rozetřeme 10 μ l IPTG, a 40 μ l X – galu a necháme v temnu vytemperovat na 37 °C, (koncentrace AMP 1g/10 ml H₂O). Reakci přeneseme na misky a rozetřeme sterilní hokejkou. Misky necháme kultivovat v temnu, při 37 °C, asi 16 hodin. Druhý den zaočkujeme nakultivované E.coli do 3 ml LB média s 12 μ l AMP (koncentrace 150 mg/10 ml H₂O), vypíchneme a zaočkujeme 2 bílé kolonie z Petriho misek (obsahují plazmid s produktem). Kultivujeme 16 hodin při 37° C. Pomocí MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin Plasmid QuickPure) byly izolovány plazmidy, tak že 1-3 ml buněčné suspenze E. coli v tekutém LB médiu, přendáme do 1,5 μ l eppendorfek a stočíme 30 s / 11000 rpm, slijeme, a pelet převrstvíme zbytkem suspenze ze zkumavky a opět stočíme. Pro buněčnou lyzi převrstvíme pelet 250 μ l pufru A1, resuspendujeme. Přidáme 250 μ l pufru A2, 6 – 8 x převrátíme, a necháme inkubovat 5 min při pokojové teplotě, přidáme 300 μ l pufru A3, a 6 – 8 x pomalu převrátíme. Pro přečištění lyzátu suspenzi centrifugujeme 10 min / 12000 rpm. Filtrát přelijeme do nových originálních eppendorfek, vložíme filtr, a nalijeme supernatant s předešlého kroku, centrifugujeme 1 min / 11000 rpm, filtrát slijeme. Filtr vložíme zpět do eppendorfky, a přidáme 450 μ l AQ, centrifugujeme 1 min / 12000 rpm. Filtr vložíme zpět do eppendorfky, a centrifugujeme 1 min / 12000 rpm. Filtr vložíme do nové eppendorfky, a přidáme 450 μ l AE. Inkubujeme 1 min, při pokojové teplotě. Stočíme 1 min / 11000 rpm. Vyizolované plazmidy restrikně štěpíme pomocí EcoRI (cílová sekvence G|AATT_C) při 37° C, po dobu 2 h. Reakce se přenesse na agarózový gel s

markerem, a následuje elektroforetická separace. Výsledkem jsou fragmenty, které mají podle genu okolo 650 bp, a následně jsou sekvenovány pomocí (CEQTM DTCS, Beckman Coulter).

3.3. Izolace celkové RNA z rostlinných buněk pomocí RNeasy Plant Mini Kit – QIAGEN

Vzorky odebereme do tekutého dusíku a skladujeme se při -80°C

1. 50 - 100 mg odebraného rostlinného materiálu rozdrtíme za současného chlazení v tekutém dusíku
2. Ihned přidáme 450 µl pufru RLT, 2 min. inkubujeme při 56°C
3. Lyzát přeneseme na drtící kolonky, a centrifugujeme 2 min/14000 rpm, přenést supernatant filtrátu do nové eppendorfky
4. Přidáme 0,5 objemu 100% ethanolu a okamžitě pipetováním promícháme, přelijeme na růžovou kolonku, centrifugujeme 15 s / 10000 rpm, filtrát slijeme
5. Přidáme 350 µl RW1, a centrifugujeme 15 s / 10000 rpm, filtrát slijeme
6. Přidáme 10 µl DNázy do 70 µl RDD pufru, převrácením opatrně zamícháme
7. Přendáme na kolonku, a necháme inkubovat 15 min.
8. Přidáme 350 µl RW1, a centrifugujeme 15 s / 10000 rpm, filtrát slijeme
9. Přendáme kolonku do nové eppendorfky, přidáme 500 µl RPE pufru, a centrifugujeme 15 / 10000 rpm, filtrát slijeme
10. Přidáme 500 µl RPE pufru, a centrifugujeme 2 min / 10000 rpm, filtrát slijeme
11. Kolonku přendáme do nové eppendorfky, starou s filtrátem vyhodíme, a centrifugujeme 1 min / 14000 rpm
12. Kolonky s navázanou RNA dáme do nových 1,5 ml eppendorfek, a přidáme 50 µl RNase-free vody, inkubujeme 1 min., centrifugujeme 1 min / 8000 rpm

3.4. Izolace mRNA pomocí Oligotex mRNA kit – QIAGEN

1. K 50 μ l RNA přidáme 200 μ l vody, 250 μ l OBB pufru a 15 μ l Oligotex suspenze, a promícháme pipetováním
2. Inkubovat 3 min. při 70°C
3. Poté inkubujeme 20 min. při pokojové teplotě
4. Centrifugujeme 2 min / 14000 rpm, a opatrně odpipetovat supernatant
5. Pelet resuspendujeme ve 400 μ l pufru OW2 pipetováním, a přeneseme na kolonku, centrifugovat 1 min / 14000 kolonky dáme do nových 1,5 ml eppendorfek, a přidáme 400 μ l pufru OW2, slijeme filtrát
6. Kolonky dáme do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 2 x 20 μ l horkého OEB pufru (70°C), 3-4 x promícháme pipetováním, a centrifugujeme 1 min / 14000 rpm

3.5. Reverzní transkripce (Omniscrypt Reverse Transcription – QIAGEN)

Rozpis reakce na 1 vzorek:

10 x RT pufr	2,0 μ l
dNTPs	2,0 μ l
oligo d(T)₁₈ (10μM)	2,0 μ l
inhibitor RNázy (10 U/μl)	1,0 μ l
rev. transkriptáza	1,0 μ l
mRNA	12,0 μ l

Reakce probíhá 2 h v termostatu při 37°C.

3.6. RT - PCR

Rozpis reakce na 1 vzorek:

cDNA	2,5 μ l
dNTP's	2,5 μ l
pufir	2,0 μ l
primer (forward + reverse)	0,25 μ l + 25 μ l
H₂O	17 μ l

Reakce probíhá v termocycleru.

Cyklus:
42 x 94°C / 30 s (deneturance)
 45°C / 30 s (annealing)
 72°C / 1 min. (elongace)
72°C 5 min.

Ligace PCR produktu do vektoru

3.7. Klonování – pomocí QIAGEN PCR Cloning Kit

1. den

a, příprava ligační směsi

1, Na ledu necháme rozmraznout 2 x Ligation Master Mix, pDrive cloning vector DNA, a PCR Produkt

2, Složená ligační reakce

pDrive Cloning Vector (50 ng/ μ l)	0,5 μ l
PCR produkt	2,0 μ l
Ligation Master Mix 2x	2,5 μ l
Celkový objem	5 μl

3, Reakční směs jemně promícháme a inkubujeme 30 minut v ledničce (4 – 16°C)

Klonovací reakce pro větší PCR produkty

1. 1 µl Salt Solution + 1 µl vektoru + 3 µl PCR.
2. 30 minut nechat stát při pokojové teplotě.
3. přidat 1 ampulku kompetentních buněk E.c.

b, Transformace

- 1, Na ledu si necháme rozehrát kompletní QIAGEN EZ buňky, a při pokojové teplotě necháme temperovat SOC médium
- 2, 5 µl ligační směsi přidám k 17 µl kompletní QIAGEN EZ buněk, jemně pomícháme špičkou, a necháme 5 minut inkubovat na ledu
- 3, Po proběhlé inkubaci, provedeme tepelný šok v termocykleru 42° C / 30 s
- 4, Inkubujeme 2 minuty na ledu
- 5, Přidáme 150 µl SOC a inkubujeme v třepačce při 37°C / 200 rpm, po dobu 15 minut
- 6, Na Petriho misky s pevným LB médiem rozetřeme 10 µl IPTG, a 40 µl X – galu a necháme v temnu vytemperovat na 37 °C, (koncentrace AMP 1g/10 ml H₂O)
- 7, Reakci přeneseme na misky a rozetřeme sterilní hokejkou
- 8, Misky necháme kultivovat v temnu, při 37 °C, asi 16 hodin

2. den

Očkování E. coli do tekutého média

- 1, do 3 ml LB média s 12 µl AMP (koncentrace 150 mg/10 ml H₂O), vypíchneme a zaočkujeme 2 bílé kolonie z Petriho misek (obsahují plazmid s produktem)
- 2, kultivujeme 16 hodin při 37° C

3. den

Izolace plazmidů – pomocí MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin Plasmid QuickPure)

1, kultivace a výtěžek bakteriálních buněk

- 1 – 3 ml buněčné suspenze E.coli v LB médiu, přendáme do 1, 5 µl eppendorfek a stočíme 30 s / 11000 rpm, slijeme a pelet převrstvíme zbytkem suspenze ze zkumavky a stočíme 30 s / 11000, slijeme

2, buněčná lyze

- pelet převrstvíme 250 µl pufru A1, a pipetou resuspendujeme, přidáme 250 µl pufru A2, 6 – 8 x pomalu převrátíme a necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, přidáme 300 µl pufru A3, a 6 – 8 x pomalu převrátíme

3, čištění lyzátu

- suspenzi centrifugujeme 10 min / 12000 rpm, při pokojové teplotě

4, navázání DNA

- do nových originálních eppendorfek vložíme filtr, a nalijeme supernatant z kroku 3, centrifugujeme 1 min / 11000 rpm, slijeme filtrát

5, promývání silica membrány

- filtr vložíme zpět do eppendorfky, a přidáme 450 µl pufru AQ, centrifugujeme 3 min / 11000 rpm, slijeme filtrát

6, sušení silica membrány

- filtr vložíme zpět do eppendorfky, a centrifugujeme 1 min / 12000 rpm

7, eluce čisté DNA

- filtr vložíme do nové eppendorfky, a přilijeme 450 µl pufru AE, inkubujeme 1 min, při pokojové teplotě 1 min / 11000 rpm

3.8. Restrikční štěpení pomocí Eco RI

Rozpis reakce na 1 vzorek:

pufr Eco RI	1,0 µl
polymeráza Eco RI	1,0 µl
plazmid	3,0 µl
celkový objem reakce	5,0 µl

- reakce probíhá 2 hodiny při 37 °C v termostatu

3.9. Elektroforetická separace

Složení 1,5 % gelu (rozpis na 100 ml):

5 x TBE (Tris 54 g, k. boritá 27,5 g, 0.5 M EDTA 20 ml, pH = 8, 0)	20 ml
destilovaná voda	80 ml
agaróza	3 g
celkový objem	100 ml

- gel rozvaříme v Erlenmayerově baňce, a po zchlazení přidáme 2 μ l EtBr (etidium bromid)
- nalijeme na vanu s hřebínky
- po ztuhnutí, pipetujeme do slotů reakci smíchanou s 2 μ l nanášecího pufru
- elektroforetická separace 2 hodiny při 90 V

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

DTCS Quick Start Master Mix	8,0 μ l
1,6 μM primer (M13 reverse, T7)	2,0 μ l
325 ng plazmidové DNA (do 5 kbp)	0,5-10,0 μ l
dH₂O (doplnit na objem 20 μ l)	0-9,5 μ l

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

Cyklus: 96°C 20s denaturace
50°C 20s annealing
60°C 4 min. elongace

30 cyklů

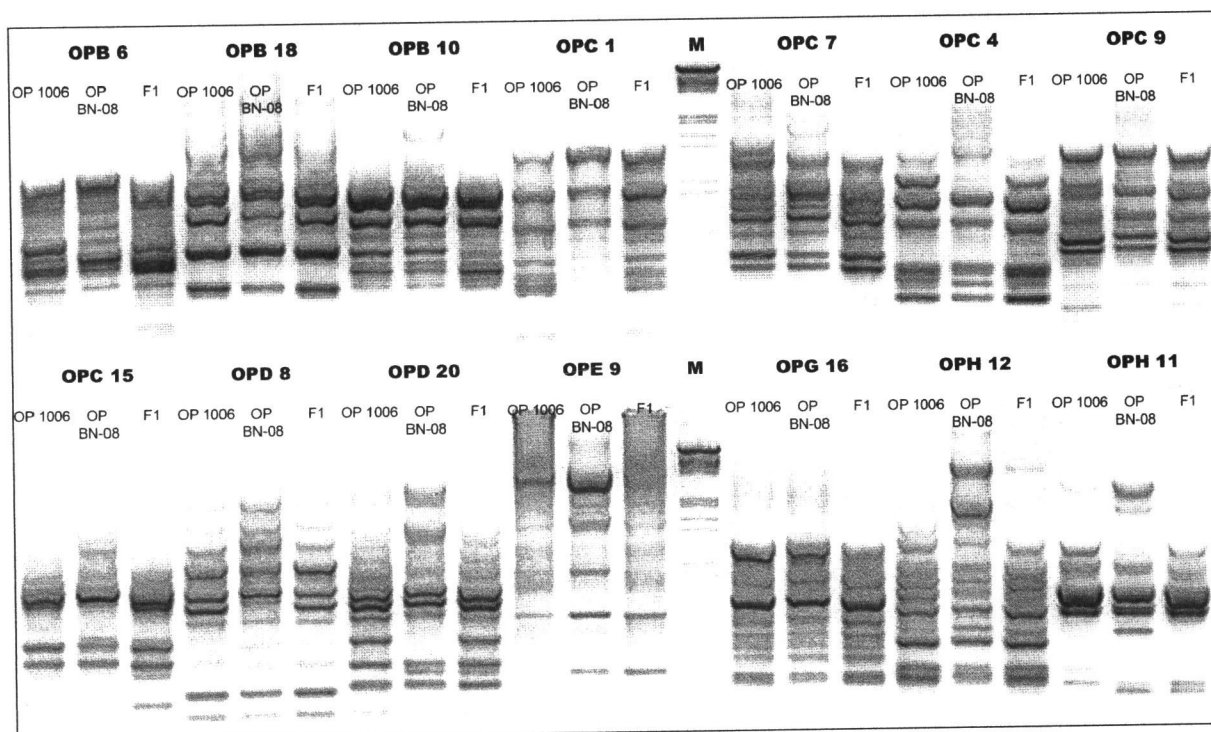
3.11. Přechištění sekvenační reakce

1. Připravíme si čerstvý roztok stop pufru před každým přechištěním, složení na jednu reakci: 2 μ l 100mM EDTA, 2 μ l 3M octanu sodného (pH 5,2), 1 μ l glykogenu; směs promíchat a přidat ke každé reakce 5 μ l
2. přidáme 60 μ l chlazeného 96% ethanolu
3. centrifugace po dobu 15 min při 14000 rpm a při 4°C
4. pipetou odsajeme supernatant a přidáme 200 μ l chlazeného 70% ethanolu, 5 min při 14000 rpm a při 4°C
5. pipetou odsajeme supernatant a pelet nechat uschnout na vzduchu.

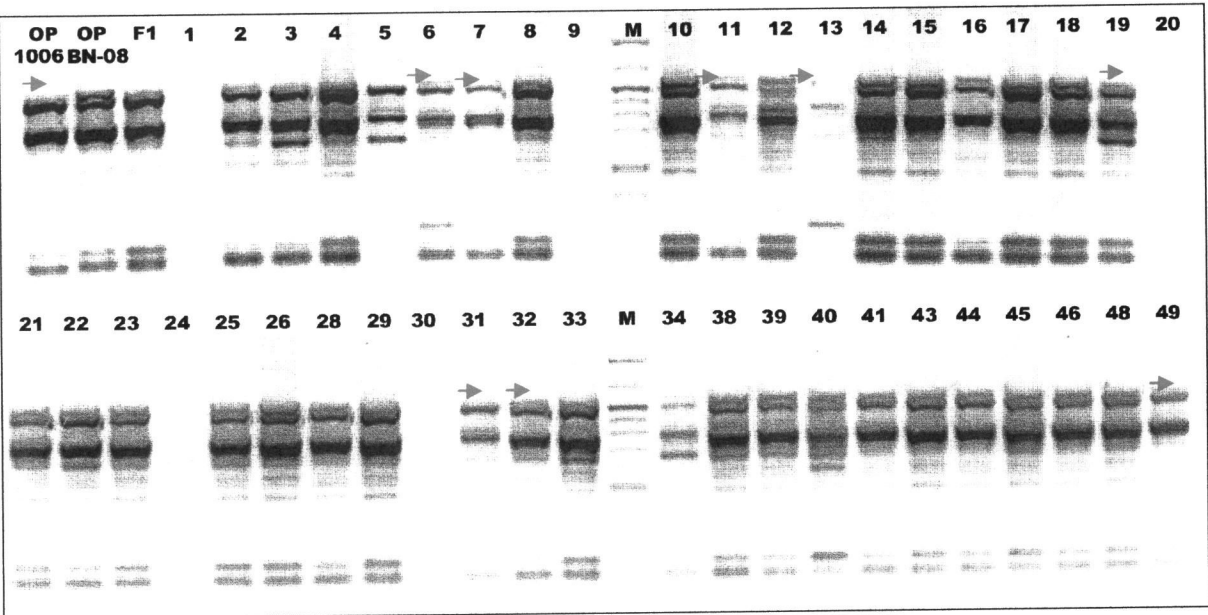
4. VÝSLEDKY

Analyzováno bylo celkem 39 rostlin F2 generace, pocházejících z křížení kontrastních linií v obsahu k. linolenové, linie BN-08 s obsahem 18:3 9,38% a linie OP 1006 s obsahem 2,37%. U obou rodičovských linií a rostliny z F1 populace byl proveden skrínig 52 primerů ve snaze nalézt vhodný primer poskytující nejlépe kodominantní RAPD markery (obr. 2). Na základě skrínigu byla provedena RAPD analýza s osmi vybranými primery (OPR 12, OPS 1, OPB 9, OPA 7, OPB15, OPB12, OPK 1 a 25 (Tanhuanpää et al., 1995; Somers et al., 1998). Po RAPD analýze bylo vytipováno celkem 5 pruhů segregujících s nízkým obsahem k. linoleové a 4 pruhy pro vysoký obsah k. linolenové. Obsah kyseliny linolenové stanovený pomocí plynové chromatografie, bohužel nebyl příliš kontrastní, pro hodnocení byly vytvořeny dvě skupiny: 3 rostliny s nízkým obsahem (4,68% a méně), a 15 rostlin s vysokým obsahem (6% a výše). S vysokým obsahem k. linolenové nejlépe koreloval marker amplifikovaný s primerem B12, který označoval 60% rostlin s vysokým obsahem a 33% rostlin s nízkým obsahem. Nízký obsah zase nejlépe koreloval s RAPD markerem primeru B15 (obr. 3), který označoval 33% rostlin s nízkým obsahem a 7% rostlin s vysokým obsahem.

Obr. 2. Ukázka skrínigu RAPD primerů.



Obr. 3. RAPD s primerem B15. Šipka označuje vzorky, kde není dvojpruh stejně jako u linie s nízkým obsahem OP 1006



Pro vytvoření specifického markeru byl analyzován gen *fad 3*. Z linií OP 1006 a BN-08 byla izolována celková RNA, ze které byla reverzní transkripcí získána cDNA. Po elektroforetické separaci na agarózovém gelu byl u obou linií výrazný pruh o velikosti 650 bp. Tento fragment byl u obou linií vyříznut z gelu a sekvenován. Získané sekvence cDNA genu *fad 3* byly vyhodnoceny v programu Bioedit. Po srovnání s databází NCBI byl identifikován gen *fad 3* pocházející ze řepky. Po srovnání obou sekvencí byly zjištěny 2 jednorázové změny (obr. 4.). Jedna z těchto mutací nezpůsobovala žádnou změnu v aminokyselinových sekvencích a v druhé bylo zjištěno rozpoznávací místo pro enzym *BsaXI*, avšak po provedené PCR-RFLP analýze nebyl zjištěn mezi oběma liniemi rozdíl.

Obr. 4. Sekvence nukleotidů genu *fad 3*. Sekvenovány byla cDNA genu *fad 3* u linií OP 1006 a kontrolní linie BN-08.

```

          10          20          30          40          50          60          70          80
BN-08 fad 3  ....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1006 fad 3  GTGGACATGG GAGTTTTTCA GACATTCCCTC TGCTGAACAG TGTGGTTGGT CACATTCTTC ATTCATTCAT CCTCGTTCCT

          90          100         110         120         130         140         150         160
BN-08 fad 3  TACCATGGTT GGAGAATAAG CCATCGGACA CACCACCAGA ACCATGGCCA TGTGAAAAC GACGAGTCTT GGGTTCCGTT
1006 fad 3  TACCATGGTT GGAGAATAAG CCATCGGACA CACCACCAGA ACCATGGCCA TGTGAAAAC GACGAGTCTT GGGTTCCGTT

          170         180         190         200         210         220         230         240
BN-08 fad 3  GCCAGAAAAG TGTGACAAGA ACTTGCCCCA TAGTACTCGG ATGCTCAGAT ACACTGTGCC TCTGCCCATG CTCGCTTACC
1006 fad 3  GCCAGAAAAG TGTGACAAGA ACTTGCCCCA TAGTACTCGG ATGCTCAGAT ACACTGTGCC TCTGCCCATG CTCGCTTACC

          250         260         270         280         290         300         310         320
BN-08 fad 3  CGATCTATCT GTGGTACAGA AGTCTCGGAA AAGAAGGGTC ACATTTTAAC CCATACAGTA GTTTATTTCG TCCAAGCGAG
1006 fad 3  CGATCTATCT GTGGTACAGA AGTCTCGGAA AAGAAGGGTC ACATTTTAAC CCATACAGTA GTTTATTTCG TCCAAGCGAG

          330         340         350         360         370         380         390         400
BN-08 fad 3  AGGAAGCTTA TTGCAACTTC AACTACTTGC TGGTCCATAA TGTGGGCCAC TCTTGTTTAT CTATCGTTCC TCGTTGATCC
1006 fad 3  AGGAAGCTTA TTGCAACTTC AACTACTTGC TGGTCCATAA TGTGGGCCAC TCTTGTTTAT CTATCGTTCC TCGTTGATCC

          410         420         430         440         450         460         470         480
BN-08 fad 3  AGTCACAGTT CTCAAAGTCT ATGGCGTTCC TTACATTATC TTTGTGATGT GGTGGACGC TGTCACGTAC TTGCATCATC
1006 fad 3  AGTCACAGTT CTCAAAGTCT ATGGCGTTCC TTACATTATC TTTGTGATGT GGTGGACGC TGTCACGTAC TTGCATCATC

          490         500         510         520         530         540         550         560
BN-08 fad 3  ATGGTCACGA TGAGAAGTTG CCTTGGTACA GAGGCAAGGA ATGGAGTTAT TTACGTGGAG GATTAACAAC TATTGATAGA
1006 fad 3  ATGGTCACGA TGAGAAGTTG CCTTGGTACA GAGGCAAGGA ATGGAGTTAT TTACGTGGAG GATTAACAAC TATTGATAGA

          570         580         590         600         610         620         630         640
BN-08 fad 3  GATTACGGAA TCTTCAACAA CATCCATCAC GACATTGGAA CTCACGTGAT CCATCATCTT TTCCCACAAA TCCCTCACTA
1006 fad 3  GATTACGGAA TCTTCAACAA CATCCATCAC GACATTGGAA CTCACGTGAT CCATCATCTT TTCCCACAAA TCCCTCACTA

          650
BN-08 fad 3  TCAC TTGGTC GATGCCA
1006 fad 3  TCAC TTGGTC GATGCCA

```

5. DISKUSE

Pro analýzu sníženého obsahu kyseliny linolenové v segregující populaci po křížení byly použité RAPD markery publikované ve vědeckých časopisech. Bohužel na použitém šlechtitelském materiálu RAPD markery příliš s obsahem k. linolenové nekorelovaly, což mohlo být způsobeno jiným genetickým pozadím použitého materiálu. Stanovený obsah kys. linolenové nebyl příliš kontrastní, což mohlo být ovlivněno vnějším prostředím,

Enzymatická aktivita desaturázy *fad 2* v semenech je ovlivňována vysokou teplotou dvěma různými mechanismy s různým účinkem. Dlouhodobý přímý účinek je spojen s nízkou termální stabilitou enzymu, která vede k tepelné denaturaci enzymu. Tím je snížena aktivita enzymu a sníží se i obsah k. linolové a s ním také k. linolenové. Krátkodobý nepřímý účinek je spojen se sníženou dostupností O₂, která reverzibilně inaktivuje enzym, sníží se jeho aktivita a následně obsah k. linolové (Martínez-Rivas et al., 2004).

Vliv nízkých teplot na obsah nenasycených MK byl podrobně studován u přímořské trávy *Paspalum vaginatum*. Obsah kyseliny linolové se výrazně zvyšoval v průběhu působení nízkých teplot. Tolerance k chladu koreluje se stupněm nasycení MK v membráně. Nenasycené MK nejspíše pomáhají membránám udržet polotekutý stav nutný pro biologickou funkci (Cyril et al., 2002).

Kyselina linolenová hraje nezbytnou úlohu ve fotosyntéze a kolísání její koncentrace v rozmezí od 6 až 12% je většinou způsobeno faktory prostředí (Thies, 1971). Přesně vymezené množství nenasycených MK je vyžadováno pro fotosyntetickou termostabilitu při zvýšené teplotě. Změny ve složení MK membrány zapříčiněné teplotou jsou regulovány tak, aby dosáhly velmi podobné úrovně nasycení navzdory mutacím, které složení MK narušily (Falkone, 2004).

Z uvedených údajů vyplývá, že obsah nenasycených MK je v určitém rozmezí variabilní v závislosti na tepelných podmínkách, protože plní důležité biologické funkce v rostlině. V potenciální odrůdě se sníženým obsahem k. linolenové by se tento obsah měl také měnit, ale neměl by se výrazně zvýšit na hodnoty, které jsou v běžných odrůdách.

6. ZÁVĚR

K RAPD analýze bylo celkem použito 8 vybraných primerů, pro hodnocení 39 rostlin rostlin F2 populace. Vybrané RAPD markery nekorelovaly dostatečně s rozlišným obsahem kyseliny linolenové. Jako efektivnější metoda markerování tohoto znaku bylo zvoleno cílové vyhledávání mutovaných alel *fad* genů. Získány byly sekvence *fad 3* genu dvou linií, s nízkým a vysokým obsahem kyseliny linolenové. Obě sekvence se sice lišily ve dvou jednonukleotidových mutacích, ale nebylo prokázáno, že by se jednalo dvě různé alely, z nichž jedna by byla příčinou sníženého obsahu kyseliny linolenové. Nicméně mohou sloužit jako podklad pro hledání odlišných sekvencí s mutacemi. Bylo by vhodné sekvenovat ještě více klonů *fad 3* k nalezení odlišné alely.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Arnison P. G. (1997): Hybrid seed – new systems for the next century. *Plant biotechnology institute bulletin, National research council Canada, January,(2)*.
- Baranyk P. (2000): Habilitační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, agronomická fakulta. s 123.
- Baranyk P. (2005): Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2005/06. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha.
- Browse J., Somerville C. R. (1991): Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 467-506.
- Cyril J., Rowell G. L., Duncan R. R. (2002): Changes in membrane polar lipid fatty acids of *seashore paspalum* in response to low temperature exposure. *Crop science* 42(6):2031-2037.
- Delourme R., Eber F., Renard M. (1991): Radish cytoplasmic male sterility in rapeseed – breeding restorer lines with a good female fertility. *Proc. of the 8th Int. Rapeseed Conference, Saskatoon, Canada: 1506-1510*.
- Ecke W., Uzunova M., Weißleder K. (1995): Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.) II. Localization of genes controlling erucic acid synthesis and seed oil content. *Theor Appl Genet* 91: 972-977.
- Falcone D. L., Ogas J. P., Somerville R. C. (2004): Regulation of fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BCM Plant Biology* 4: 17. [online]. Dostupné na <http://www.biomedcentral.com>.
- Fábry A. et al. (1992): Olejniny, MZ ČR, České Budějovice, s 14.

- Fourmann M., Barret P., Froger N., Baron C., Charlot F., Delourme R., Brunel D. (2002): From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theor Appl Genet* 105: 1196-1206.
- Heinz E. (1993): Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. In: Moore T., S., Jr (ed) *Lipid metabolism in plants*. CRC Press, Boca Raton, Fla., 34-89.
- Holas J. a Souček J. (1999): Alternativní využití řepky olejné. *Sborník SVŘ, Hluk 1999*, s 177 – 179.
- Hosnedl V., Vašák J., Mečiar L. (1998): Rostlinná výroba –II (Luskoviny, olejniný). *Agronomická fakulta ČZU v Praze, katedra rostlinné výroby*, s 180.
- Chen J. L., Bevesdorf W. D. (1990): Fatty acid inheritance in microspore-derived populations of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 80: 465-469.
- Hu J., Quiros C., Arus P., Struss D., Röbbelen G. (1995): Mapping of a gene determining linolenic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. *Theor Appl Genet* 90: 258-262.
- Hu J., Li G., Struss D., Quiros C. F. (1999): SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed *Brassica napus*. *Plant breeding* 118 (2): 145-150.
- Jourdren C., Barret P., Horvais R., Delourme R., Renard M. (1996): Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica* 90: 351-357.
- Lemioux B., Miguel M., Somerville C., Browse J. (1990): Mutant of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor Appl Genet* 80: 234-240.
- Martinez-Rivas S. M., Mancha M., Hernandez M. L. (2004): Molecular cloning characterization genes encoding two microsomal oleate desaturases (*FAD2*) from olive. *Phytochemistry* 46(12):1417-1426.

Miguel M., Browse J. (1992): *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 267: 1502-1509.

Paulmann W. (1999): Pokrok ve šlechtění hybridní řepky a pěstování MSL – hybridné odrůdy. Sborník SVŘ SPZO, Hluk, 96-99.

Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rouselle P., Renard M. (1983): Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191: 244-250.

Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Renard M., Pellan –Delourme R. (1987): Molecular, phenotypic and genetic characterization of mitochondrial recombinants in rapeseed. *Proc. of 7th Int. Rapeseed Congress, Poznan, Pologne*: 113-118.

Pleines S., Friedt W. (1989): Genetic control of LA concentration in seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 78: 793-797.

Rosypal S., Doškař J., Petrzik K., Růžičková V. (2002): Úvod do molekulární biologie. Katedry genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty MU v Brně, s 296.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis R.B., Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Scheffler J. A., Scharpe A. G., Schmidt H., Sperling P., Parkin I. A. P., Lühs W., Lydiat D. J., Heinz E. (1997): Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. *Theor Appl Genet* 94: 583-591.

Somers D. J., Friesen K. R. D., Rakow G. (1998): Identification of molecular markers associated with linolenic acid desaturation in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 96: 897-903.

Řehout V., Čítek J., Sáková L. (2000): Genetika I (Úvod do studia genetiky). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta, s 256.

Tanhuanpää P. K., Vilkki J. P., Vilkki H. J. (1995): Association of RAPD marker with linolenic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome* 38: 414-416.

Tanhuanpää P., Schulman A. (2002): Mapping of genes affecting linolenic acid content in *Brassica rapa* ssp. *Oleifera*. *Mol Breeding* 10: 51-62.

Thelen J. J., Ohlrogge J. B. (2002): [cit. 30. září 2004] Metabolic Engineering of Fatty Acids Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering* 4: 12-21. [online]. Dostupné na <http://www.idealibrary.com>.

Thies W. (1971): Schnelle und einfache Analysen der Fettsäure-Zusammensetzung in einzelnen Raps Kotylodonen. I. Gaschromatographische und papierchromatographische Methoden. *Z Pflanzenzuecht* 65: 181-202.

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, Canberra. Australia.

Vašák J., Fábry A., Zukalová H., Morbacher J., Baranyk P. (1997): Systém výroby řepky. Česká a slovenská pěstitelská technologie ozimé řepky pro roky 1997 – 1999. SPZO Praha, srpen 1997, s 116.

8. Použité zkratky

AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů, Amplified Fragment Length Polymorphism
AI	autoinkompatibilita, autoinkompatibilní reakce
AK	autokompatibilita, autokompatibilní reakce
AMP	adenosinmonofosfát
ATB	antibiotika
bp	páry bází, base pairs
CMS	cytoplasmatická forma samčí sterility, (cytoplasmatic male sterility)
dATP	deoxyadinintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanidintrifosfát
dTTP	deoxythymintrifosfát
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
ddNTPs	dideoxynukleotid trifosfáty
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová
Elfo	elektroforéza
Etbr	ethidium bromid
ER	endoplazmatické retikulum
F1 hybrid	hybrid vznikající v první filiální generaci, u něhož dochází k největšímu projevu heterózního efektu
GMS	jaderná samčí sterilita
GSL	glukosinuláty
IPTG	izopropyl- β -D-tiogalaktozidáza
Kb	kilobáze
KE	kyselina eruková
MK	mastná kyselina
MSL	Male Sterility Lembke
PAGE	polyakrylamidový gel
PCR	polymerázová řetězová reakce - Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů u produktů PCR = CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences)
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA - Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů - Restriction Fragment Length Polymorphism
+ RH	restaurovaný hybrid
RNA	kyselina ribonukleová
SPLAT	amplifikace specifických polymorfních lokusů - Specific Polymorphic Locus Amplification Test)
Taq	termofilní polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminometan
X-Gal	X - Gel
VNTR	variabilita počtu tandemových repetitiv - Variability of Number Length Polymorphism

1. VYBRÁNÍ TYPU VÝSTUPOVÉHO
 2. VYBRÁNÍ TYPU VÝSTUPOVÉHO
 3. VYBRÁNÍ TYPU VÝSTUPOVÉHO
 4. VYBRÁNÍ TYPU VÝSTUPOVÉHO