

2. Literární přehled

2.1.

Genetické pozadí rodu *Brassica L.*

Druhy rodu *Brassica* se vyznačují obecně velkou genetickou variabilitou. Základní druhy mají nízký počet chromozomů: *B. campestris*, *B. rapa* mají genom A, n=10; *B. nigra* - genom B, n=8 a *B. oleracea* - genom C, n=9. Ostatní druhy jsou amfidiploidní a vlastní kombinaci genomů základních druhů: *B. juncea* AB (n=18), *B. cernua* a *B. napus* AC (n=19) a konečně *B. carinata* BC (n=17).

Rezistence k *L. maculans* byla identifikována u *B. rapa* subsp. *Sylvestris* (Mithen et al., 1987), u druhů s C-genomem (Mithen et Lewis, 1988) u *B. napus* (Rimmer et van den Berg, 1992) a konečně u druhů obsahujících B-genom (Chèvre et al. 1996, 1997; Plieske et al. 1998).

Lokalizace genů rezistence na jednotlivých chromozómech rostlin ukázala, že jejich rozdělení není náhodné. Často se více genů rezistence nachází na jednom chromozómu a geny jsou soustředěny v blocích, v nichž jsou ve vazbě. V blocích nebývají jen geny rezistence k jednomu patogenu, ale někdy i k více různým patogenům (Lebeda, 1988).

Všechny druhy rodu *Brassica* obsahující B-genom vykazují absolutní a trvalou rezistenci k většině, do této doby studovaných, agresivních izolátů patogena (Snowdon, Winter et al., 2000). Bylo zjištěno, že rezistence vázaná na B-genomu je oligogenně kontrolována (Sacristán et Gerdemann, 1986; Sjödin et Glimelius, 1988; Gugel et al., 1990; Chèvre et al., 1996; Struss et al., 1996) a fenotypový projev této rezistance u *B. nigra*, *B. juncea* a *B. carinata* je velmi podobný (Plieske et al., 1998).

2.2.

Charakteristika patogena

Z přibližně 250 000 druhů hub známých k tomuto datu, jsou asi z 75% *Ascomycota*, z nichž přinejmenším tři podtřídy zahrnují specializované rostlinné patogeny. Náleží sem tedy i podtřída *Dothideomycetidae*, která zahrnuje nejdůležitější patogeny pšenice, ječmene, zeleniny, ovoce, olejnin atd. (názvosloví dle Kúdely et al., 2002).

L. maculans byla poprvé popsána Todem v roce 1791. Černání stonku našel na odumřelém stonku kapusty a patogen nazval *Sphaeria lingam*. Roku 1849 našel Desmazieres stejnou houbu na živých rostlinách a přejmenoval ji na *Phoma* (*Phoma lingam*). Sexuální stádium *P. lingam* první objevil v roce 1956 Smith. Pojmenoval ho *Leptosphaeria napi*. Na *L. maculans* jméno nakonec změnil v roce 1964 Smith, Sutton, Boerema a van Kesteren (Zhu et Rimmer, 2003).

Leptosphaeria maculans (*Desm.*) *Ces. & de Not.* (anamorfa *phoma lingam*), náležící do čeledi *Leptosphaeriaceae*, je haploidní houba s malým genomem (okolo 34 Mb). Byly vyvinuty úvodní genové a fyzikální mapy této houby, a byly zmapovány tři geny asociované s hostitelskou specificitou (Howlett et al., 2001).

Phoma lingam škodí na řepce především v Australii, Kanadě a Evropě. Hostitelskými rostlinami jsou všechny pěstované brukvovité plodiny (zelenina, olejnin, pícniny, plodiny na zelené hnojení) a brukvovité plevele (Státní rostlinolékařská zpráva, 2004).

Ondřej (1987) popisuje dva rozdílné symptomy vyvolané tímto patogenem na řepce. Jednak listovou skvrnitost na jaře a dále pak odumírání lodyh v období dozrávání. Projevu druhého symptomu - rakoviny lodyh, předchází latentní perioda. Fáze napadení lodyh při dozrávání má svůj počátek v listové skvrnitosti na podzim a na jaře. Houba přechází na lodyhy postupným prorůstáním z listů a ne tedy druhotně vyklíčením pykno spor na lodyhách. Rakovině lodyh nutně předchází systematická kolonizace listů. Houba se pak šíří do lodyh intracelulárně řápkem, aniž by vyvolala nekrózu a odumření. V této fázi je houba vysloveně biotrofní a šíří se rostlinou bez projevů vnějších symptomů choroby. Druhá fáze je již nekrotrofní. Tyto dvě rozdílné fáze se každoročně střídají. Toto střídání ovšem platí pouze pro agresivní kmeny

houby. Většina kmenů je málo virulentních a udržuje se v porostu jen ve fázi napadení listů, tedy bez schopnosti intracelulárního proniknutí do lodyh .

Ke škodlivému rozšíření této choroby na řepce u nás došlo v době zavádění odrůd se sníženým obsahem kyseliny erukové (Flanderková, 1987). Mezi obsahem glukosinolátů a rezistencí nebyla nalezena žádná spojitost (Wretblad, 2002).

První výskyt choroby je možné zaznamenat již na podzim, na starších listech a kořenových krčcích. V jarním období v dubnu a květnu se objevuje na kořenovém krčku výrazná suchá hniloba, zahnědlá místa a zkorkovatělé trhliny. Dochází ke zpoždění růstu a předčasnému zasychání rostlin. K infekci pletiva a pomalému růstu mycelia dochází většinou v místech poranění i při nízkých teplotách (Holmanová, 2003). Epidemický výskyt choroby je způsoben askosporami, uvolňovanými z peritécií, tvořících se koncem léta a na podzim na zbytcích rostlin, které jsou tedy hlavním zdrojem infekce. K největšímu uvolňování askospor dochází při průměrné teplotě 15 °C a zvýšené srážkové činnosti.

V prvních fázích vývoje rostliny je patogen schopen proniknout v místě kořenového krčku bez předchozího poškození, od fáze 4 – 6 listů je k proniknutí parazita poškození prakticky nutné (Flanderková, 1987).

Na napadeném pletivu se tvoří pyknidy, viditelné jako drobné černohnědé tečky. Pyknidy jsou lahvicovité až čočkovité a obsahují dvoubuněčné hyalinní válcovité pyknospory (Čača et al., 1981). Poškození listů nemá ve vztahu k výnosu obvykle příliš velký význam. Nejzávažnější je napadení krčku v předjarním a jarním období. V našich podmínkách je nejčastější příznak v pozdější fenofázi - ve spodní třetině stonku, kde má podobu nepravidelné, víceméně oválné, fialově hnědé zasychající skvrny. Skvrna může, ale nemusí obepínat celý stonek.

Houba přechází i do semen, která jsou v důsledku napadení menší, deformovaná a špatně vyzrálá. Příznak na semeni může být i latentní, přežívání houby je možné ve formě mycelia v osemeni (Prokainová, 2003).

2.3.

Podstata rezistence

Ochrana rostlin proti chorobám, založená na přirozené odolnosti pěstovaných odrůd, je základem jejich integrované ochrany. Pěstování odrůd s odpovídající rezistencí k chorobám navíc snižuje potřebu chemické ochrany, což je příznivé nejen z hlediska ekonomického, ale i ekologického.

Původce fomového černání stonku má silné sklony měnit se pod selekčním tlakem způsobeným geny rezistence u komerčních odrůd. Vysoký evoluční potenciál houby nutí šlechtitele efektivně rozvinout trvalou rezistenci (Howlett, 2004).

2.3.1.

Zdroje odolnosti

Jako zdroj genů rezistence pro šlechtění slouží přirozený genofond kulturních rostlin a jim příbuzných planých druhů. Prostředkem pro získání potomka se žádanými znaky je **křížení**.

Při **vnitrodruhové hybridizaci** křížíme vhodné odrůdy či linie. V případě rezistentního šlechtění je použita odolná odrůda jako donor genu rezistence pro náchylnou odrůdu s hospodářsky významnými znaky. V historii šlechtění řepky na odolnost vůči *phoma lingam*, představuje genetický základ této rezistence v Evropě z největší části francouzská odrůda Jet Neuf. Tato odrůda disponuje částečnou, polygenně kontrolovanou rezistencí, projevující se jen ve stadiu dospělosti rostliny (Cargeeg et Thurling, 1980). Jako donorová odrůda byl dále používán např. Capitol (Balesdend et al. 2002) či Darmor (Pilet et al., 1998a), který byl odvozen od právě zmiňované odrůdy Jet Neuf .

Vzdálená hybridizace probíhá na úrovni rodového nebo druhového křížení. Poprvé byl úspěšný přenos rezistence z indické linie (BJ168) *B. juncea* do *B. napus* popsán Royem roku 1978. O šest let později Roy vyvodil, že gen(y) rezistence se nachází na B-genomu, a proto by všechny druhy nesoucí tento genom měly

vykazovat stejnou úroveň odolnosti, což bylo potvrzeno (Chèvre et al. 1997; Snowdon, Winter et al., 2000). Z tohoto důvodu jsou také donoři B-genomu jako *B. juncea* či *B. nigra* často využíváni k vývoji odolné odrůdy řepky (Roy, 1978; Sacristán et Gerdemann, 1986; Sjödin et Glimelius, 1989; Chèvre et al. 1996; Struss et al., 1996; Plieske et al., 1998; Dixelius, 1999). Avšak vzhledem k tomu, že *L. maculans* vykazuje vysoký potenciál adaptovat se (Kuswinanti et al., 1999), se ukázalo, že některé izoláty patogena již rezistenci pocházející z *B. juncea* překonaly (Winter et al. 1999). To je také důvodem, proč jsou jako donoři genů rezistence používány i příbuzné plané druhy jako je *Sinapis arvensis* L. (genom SarSar 2n=18).

Sexuální hybridizaci mezi *S. arvensis* a *B. napus* popisují různí autoři (Kerlan et al., 1993; Plümper, 1995; Bing et al., 1996). *S. arvensis* vykazuje vysoký stupeň rezistence vůči rozličným izolátům *L. maculans*. Potomstvo vzniklé zpětným křížením mezi *B. napus* a *S. arvensis* bylo podrobena fytopatologickým studiím a molekulární cytogenetické analýze, GISH (genomic *in situ* hybridization). BC₃S generace zahrnovala fertillní rostliny vykazující vysokou odolnost jak semenáčků, tak dospělých rostlin, asociovanou s přítomností akrocentrického aditivního chromozómu *S. arvensis*. U některých jedinců odolných jen ve stadiu dospělosti rostliny, se zdál být karyotyp *B. napus* normální a GISH nevykazovala žádné viditelné signály. Fytopatologická analýza tří různých jedinců z BC₃S generace ukázala, že odolnost semenáčků a odolnost dospělých rostlin pravděpodobně koresponduje s odlišnými lokusy (Snowdon, Winter et al., 2000).

Expresa a selekce *in vitro* - metoda explantátových kultur nabízí další možnosti pro indukci a selekci genetických faktorů (mutací) podmiňujících rezistenci vůči chorobám, a zároveň může usnadnit přenos těchto genů do šlechtitelských materiálů. Fytotoxiny produkované houbovými a bakteriálními patogeny mohou být využity k vytvoření selekčních tlaků *in vitro* a pro získání rezistentních genotypů. Somaklonální variabilita u rostlin regenerovaných *in vitro* může zahrnovat vznik nových genotypů s dědičně podmíněnou tolerancí nebo rezistencí vůči houbovým, bakteriálním i virovým onemocněním (Novák, 1990).

Transgeny, které kódují chitinázy, zvyšují rezistenci rostlin k houbovým chorobám. V polních podmínkách byly testovány rostliny řepky olejky s transgenem pro chitinázu, které vykazují zvýšenou odolnost k různým houbovým patogenům, jako je

Phoma lingam, *Cylindrosporium concentricum*, *Sclerotinia sclerotinium* (Řepková et Relichová, 2001).

Indukované mutace mohou být dalším zdrojem rezistence. Indukované mutace zpravidla ovlivňují odolnost založenou monogenně recesivně (Lebeda, 1988). Mutagenních zákroků se zpravidla využívá k získání translokací nesoucích odolnost při vzdáleném křížení.

2.3.2

Genetika rezistence

2.3.2.1.

Základní kompatibilita

Kompatibilita rostliny a patogena může být nespecifická, specificky diferencovaná či spec. nediferencovaná. Nespecifická kompatibilita se týká rostlin s nesespecializovanými patogeny (např. *Pseudomonas syringae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii* atd.), které mají široký okruh hostitelů.

Specificky diferencovaná kompatibilita je geneticky často determinována na bázi gen-proti-genu. V tomto systému, nadřazenému základní kompatibilitě, odpovídají jednotlivým genům rezistence příslušné jednotlivé geny virulence. Lokalizace elementů kontrolujících interakci odrůda (linie, kmen) - rasa, je nezávislá na těch, které kontrolují základní kompatibilitu (Bushnell et Rowell, 1981). Obecně je tento typ kompatibility velmi nestabilní.

Systém specificky nediferencované kompatibility kontroluje rasově nespecifickou rezistenci a nepodléhá tak rychlým mikroevolučním změnám, jako je tomu u specificky diferencované kompatibility (Lebeda, 1988).

2.3.2.2.





Interakce hostitel – patogen

Studium molekulárních základů interakce hostitel-patogen spadá do dvou oblastí. Jde jednak o sledování a analýzu reakce rostliny vůči patogenu a zároveň i o sledování variability v rezistenci k určitému patogenu (Řepková et Relichová, 2001).

Principy studia genetických interakcí mezi hostitelem a patogenem rozpracoval Flor na základě své experimentální práce se rzi Inovou ve své hypotéze gen-proti-genu (1955). Podle ní každému genu rezistence u hostitele odpovídá gen pro avirulenci u patogena. Obvykle rezistence a avirulence jsou dominantní a náchylnost a virulence recesivní (Zvára et al., 1991). Aplikace této hypotézy umožňuje stanovení přibližného počtu genů rezistence a patogenity a jejich kombinací. Vztah jednoho genu patogenity proti jednomu genu rezistence je z evolučního hlediska nejjednodušší případ. Hypotézu gen-proti-genu nelze tedy přijmout jako univerzální k objasnění vztahů hostitel-patogen.

V přirozené populaci patogena probíhá selekce forem, které překonávají nejrozšířenější geny rezistence v populaci hostitele, zatímco v přirozené populaci hostitele se selektují formy, jenž patogen není schopen napadnout. Jakmile v populaci patogena převládne rasa napadající většinu rostlin populace hostitele, objeví se v populaci hostitele selekčně zvýhodněná forma, která je odolná k této převládnuvší rase. Van der Plank došel k závěru, že rasy patogena s větším počtem genů patogenity mají většinou nižší kompetitivní schopnost ve srovnání s rasami s menším počtem genů patogenity (Bartoš, 1979).

L. maculans vyvíjí extrémní hostitelskou specializaci a vztah gen-proti-genu. Odolnost či náchylnost závisí na přítomnosti jednoho major genu pro rezistenci v rostlině (R) a jednoho korespondujícího genu avirulence (AVR) u patogena (viz obr. 2.1.). Toto specifické rozpoznání vede k rychlému spuštění defenzivní odpovědi rostliny na narušení listového povrchu a plně rostlinu před chorobou ochrání (Rouxel et al., 2003a).

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

Obr.: 2.1.

Příklad interakce gen-proti-genu, vyjádřené na děložních lístcích řepky. Pouze kombinace genu rezistence *Rlm1* na straně rostliny a genu avirulence *AvrLm1* na straně patogena, nevede k příznakům choroby.

Šlechtění rezistentních odrůd, tj. linií obsahujících major geny rezistence odpovídající současným genům patogenity, má jeden nepříjemný důsledek. Rozšíření těchto genů odolnosti vyvíjí silný selekční tlak na populaci patogena, který vede k jednoduché mutaci v odpovídajících avirulentních genech, což umožní patogenu překonat korespondující major rezistenci. Příkladem může být velké rozšíření major genu rezistence *Rlm1* (rozpoznávajícího gen avirulence *AvrLm1*) ve Francii v roce 1995, které v pouhých třech letech vedlo k převládnutí populace *L. maculans* bez funkční alely genu *AvrLm1* (Rouxel et al., 2003a). Jinými slovy, šlechtitelům zabralo více než deset let vnesení toho zdroje rezistence do komerčních variet, ale jen tři roky trvalo patogenu ho překonat.

Náchylnost ve vztahu k vegetačnímu stadiu rostliny

Patologickou analýzou byla zjištěna extrémní náchylnost k listové kontaminaci *L. maculans* v brzké růstové fázi rostliny (zejména ve stadiu dvou listů). Toto zjištění odhaluje velkou citlivost dvou až devítidenní rostlinky (stadium dvou a čtyř listů) k infekci oproti rostlince čtrnáctidenní ve stadiu šesti listů. Nicméně výsledky na konci růstového vývoje kolísají vzhledem ke stupni náchylnosti zkoumaných odrůd (viz tab.2.2.).

Například tolerantní (spíše odolná) odrůda Vivol je méně napadena, pokud k setkání s chorobou dojde v časně růstové fázi (dva listy). Oproti tomu dojde-li k napadení ve stádiu šesti listů, projeví se výrazně zřetelněji. Na druhou stranu

náchylná odrůda Bristol nejeví žádné výraznější rozdíly v náchylnosti mezi stadii, kdy byla napadena (Pérès et al., 1999).

Tab. 2.2. : Zobrazení závažnosti napadení *p. lingam* v různých růstových fázích u třech francouzských odrůd (rozsah napadení 1 → 6)

<i>Růstová fáze</i>	Vivol (T)	Goeland (SN)	Bristol (N)
6 listů	4,06	4,64	5,02
4 listy	3,44	4,36	4,53
2 listy	1,88	3,61	5,66

T: tolerantní, SN: spíše náchylná, N: náchylná

Z dalších výsledků Pérèse et al. (1999) vychází najevo, že v případě tolerantní odrůdy (v tomto případě Vivolu), byla všechna biologická stadia choroby delší než u náchylných odrůd. Respektive, že počet dní od prvního uvolnění askospory houby do detekce choroby na rostlině, byl výrazně vyšší než u náchylných odrůd, a tím pádem byla i síla a stupeň napadení u této odrůdy nižší.

Co se týče náchylnosti ve vztahu k formě řepky, tedy jarní či ozimé, byl na 453 vzorcích *B. napus* testován výskyt rasově specifických genů rezistence a bylo zjištěno, že frekvence a diverzita majoritních genů rezistence (*Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm4*), byla vzácnější u jarních odrůd oproti ozimům. Tedy, 65,7 % z testovaných *B. napus* bylo náchylných ke všem izolátům *L. maculans*, zatímco jen 12,2 % ozimých typů bylo prostých jednoho a více *Rlm* genu.

U jarních odrůd má nejvyšší výskyt gen *Rlm4* a to u 26,6 %, ostatní *Rlm* geny se vyskytují vzácně. U ozimů byl nejčastějším genem rezistence *Rlm2*, ve více než 45,9-54,0% a *Rlm4*, u 26,4-27,7 % genotypů (Rouxel et al., 2003).

2.3.2.3.

Kontrola a dědičnost rezistence

Rezistenci řídí hlavně jaderné faktory dědičnosti, mimojaderná-cytoplazmatická dědičnost se projevuje rozdíly ve štěpných poměrech v generacích po reciprokém křížení.

V jaderném systému je dědičnost rezistence řízena jedním nebo několika major geny u mono- či oligogenní rezistence, či více minor geny u rezistence polygenní. Expresi genů rezistence mohou ovlivňovat i jiné geny, modifikátory či inhibitory. Oligogenně založenou rezistenci řídí zpravidla geny s dominantním, řidčeji intermediálním nebo recesivním účinkem. Oligogenní rezistence odpovídá hypotéze gen-proti-genu. U polygenně založené rezistence se uplatňuje silný vliv podmínek prostředí. Projev rezistence má kvantitativní charakter (Bartoš, 1988).

Variabilitu v rezistenci rostliny k patogenu můžeme také klasifikovat podle Van der Planka jako vertikální či horizontální rezistenci :

Vertikální rezistence je rezistence rasově specifická a je řízena jedním nebo několika málo geny. Každá alela určitého lokusu odolnosti u hostitele zabezpečuje odolnost pouze vůči jedinému genotypu patogena. Tyto různé genotypy se fenotypově projevují jako fyziologické rasy, které se označují jako patotypy (izoláty). Vztah hostitel - patogen je většinou kvalitativní, může být i kvantitativní (měřený např. počtem napadených jedinců).

Horizontální rezistence je zpravidla účinná proti širokému spektru patotypů parazita, tedy rasově nespecifická. Tato odolnost má vlastnosti typického polygenně založeného znaku a projevuje se u ní silná interakce genotypu s prostředím. Je trvalejší, avšak šlechtění je náročnější než u předešlé. Má spíše kvantitativní charakter.

Geny rezistence mohou být představovány buď dvěma alelami (jednou dominantní a jednou recesivní) nebo větším počtem alel. Různé alely téhož genu vznikají mutacemi přímými a zpětnými a liší se účinností vůči různým rasám patogena.

K odhadu, které geny studované odrůdy pravděpodobně obsahují, se užívá srovnání jejich reakce s reakcemi linií se známými geny rezistence. Shoda reakcí ukazuje, že rezistenci mohou řídit tytéž geny. Identita genů rezistence se ověřuje v F₂

generaci křížení zkoušené odrůdy s linií nebo odrůdou s prokázaným genem rezistence, který se předpokládá ve zkoušené odrůdě. Pokud se nevyštěpí náchylné rostliny, jsou geny rezistence identické, alelické nebo v těsné vazbě (Benada, 1988).

Vlastní genetické založení odolnosti k *Phoma lingam* není komplexně známo. Dědičnost rezistence byla popsána jako monogenní či polygenní, zavisející na odrůdě a stáří rostliny (Rimmer et van den Berg, 1992). V různých fenofázích je odolnost řízena rozdílnými geny (Zhu et al., 2003). Jedná se tedy o široký rozsah typů dědičnosti od monogenní k polygenní, od dominantní k recesivní. Tato variabilita se odvíjí především od typu a rasy patogena (Cargeeg et Thurling, 1979; Delwische, 1980; Hill, 1991; Pang et Halloran, 1996a).

Odolnost se buď projevuje v různém stupni během celé ontogeneze odolné rostliny nebo jen v některých růstových fázích (Bartoš, 1979). U řepky olejky jsou běžně značeny dva typy rezistence vůči *L. maculans*: kvalitativní tj. úplná rezistence ve stadiu semenáčků a kvantitativní, částečná rezistence projevující se ve stadiu dospělé rostliny. První zmiňovaná je rasově specifická rezistence, kontrolovaná samotnými geny rezistence (*Rlm*) k *L. maculans*, druhá je pod kontrolou mnoha genetických faktorů (Delourme et al., 2004).

Chronologický přehled nalezených genů rezistence řepky vůči *L. maculans*:

- **1979** - Bylo zjištěno, že “Jet Neuf rezistence“ je částečná, nespecifická a polygenní (Renard et Brun, 1979). Na této odolnosti je zvláštní, že byla trvalá, navzdory širokému využívání v západní a východní Evropě po dobu přibližně deseti let (Hammond et Lewis, 1987)
- **1980** - U linie R39 a odrůdy Girta se projevovala specifická rezistence ve stadiu semenáčků, která byla kontrolována dominantními geny *Lm1* a *Lm2* (Delwiche, 1980)
- **1984** - Pomocí mezidruhové hybridizace byla přenesena kompletní rezistence z *B. juncea* do *B. napus*. Zdálo se, že je tento typ rezistence děděn jako majoritní gen nebo geny. Bylo selektováno rezistentní potomstvo a i v pozdějších generacích se vyštěpovali jak náchylní, tak odolní jedinci (Roy, 1984).

- **1991** - Semenáčky potomstva vzniklého křížením spíše náchylné a odolné odrůdy (*Brassica napus* L. subsp. *oleifera*) vykazovaly dědičnost rezistence. U potomstva, vzniklého křížením odrůdy Bingo (náchylná) a cv. Topas (odolná), kontroloval rezistenci k izolátu Lm1190 recesivní gen. U cv. Topas byly nalezeny dva komplementární dominantní geny, působící proti izolátu Lm1190. Zkřížením cv. Westar (N) a cv. Cyclone (O) bylo zjištěno, že cv. Cyclone vlastní jeden či dva recesivní geny rezistence, interagující s izolátem Lm1192 (Hill, 1991).
- **1991** - Potomstvo vzniklé křížením kombinací náchylných a odolných odrůd vykazovalo rezistenci k virulentnímu izolátu LM26, pocházejícímu z Manitoby v Kanadě. Křížení bylo provedeno mezi DH (double haploid) rostlinami řepky (subsp. *oleifera*) odrůd: Global, Karat, Marnoo, Regent, Topas a Westar a liniemi A0087 a MR). Nalezená rezistence se zdála být polygenní a zejména recesivní (Sippel et al., 1991).
- **1992** - Dědičnost rezistence k izolátu RF MLM 11 byla testována na syntetických liniích *B. napus*, u linie 235 (vysoce rezistentní) a linie 233 (vysoce náchylná). F₁ hybridy (linie 235 x 233) měli středně velké poškození v porovnání s rodičovskými liniemi, indikující, že rezistence a náchylnost jsou kodominantní. Podle vyštěpení F₂ potomstva z hlediska velikosti poškození se dá usuzovat, že je tato rezistence determinována polygenním systémem (Mithen et Magrath, 1992).
- **1992** - rezistence australské cv. Maluka a Shiralee byla kontrolována jedním dominantním genem (Stringam et al., 1992).
- **1995** - Odrůda Major obsahovala gen rezistence pojmenovaný LEM1, lokalizovaný na vazbové skupině šest. Tento gen se vztahoval k odolnosti ve stadiu semenáčků (Ferreira, 1995).
- **1995** - Byl objeven gen *LmFr1*, kontrolující rezistenci dospělých rostlin u Francouzské cv. Crésor. Mapování QTL (quantitative trait loci), poukázalo na to, že byl do rezistence zapojen jediný chromozomální region. Mendelská analýza konečně potvrdila přítomnost jediného major genu. Tento gen je umístěn na vazbové skupině N7 (Dion et al., 1995), která se zdá být ekvivalentní vazbové sk. 6 Ferriery et al. (1995)

- **1996** - Byla popsána rasově specifická rezistence semenáčků cv. Quinta a Glacier, kontrovaná dvěma dominantními geny, **Rlm1** (x *AvrLm*) a **Rlm2** (x *AvrLm2*) (Ansan-Melayah, 1996).
- **1996** - Rezistence dospělých rostlin pocházející z *B. juncea* byla zkoumána na F₂ a F₃ potomstvu, vzniklém křížením linie nazvané R13 a náchylnou kanadskou cv. Tower. Štěpné poměry v F₂ naznačovaly, že je rezistence kontrolována major geny. Štěpné poměry F₃ populace byly v souladu se zapojením tří jaderných genů, nazvaných **Bl₁**, **Bl₂**, **Bl₃**. V tomto komplexu je **Bl₁** epistatický (nadřazený) k **Bl₂** a **Bl₃**, **Bl₂** a **Bl₃** mají komplementární genový účinek (Pang et Halloran, 1996a).
- **1996** - Byla studována dědičnost odolnosti dospělých rostlin k izolátu MB2 na F₂ a BC₁ potomstvu, vzniklém zkrížením rezistentní cv. Maluka a vysoce náchylné cv. Niklas. Rezistence byla dominantní a zdála se být kontrolována jedním, neúplně dominantním major genem (Pang et Halloran, 1996b).
- **1997** - U odrůdy Shralee byla rezistence kontrolována jedním major genem, nazvaným **LmR1**, který byl také umístěn na vazbové skupině N7 (Mayerhofer et al., 1997).
- **2004** - Byly objeveny dva nové geny, **LepR1** a **LepR2**, kontrolující odolnost řepky ve stadiu semenáčků proti většině izolátů z různých patogenních skupin. **LepR1** disponuje vyšším stupněm rezistence než **LepR2**. Zdá se, že **LepR1** i **LepR2** rozpoznávají většinu ras *L. maculans* v Australii (Yu, Lydiate et Rimmer, 2005).

Již dříve byly charakterizovány tři specifické *Rlm* geny pocházející z *B. napus* (*Rlm1*, *Rlm2* a *Rlm4*). Nyní však byly identifikovány dva nové geny rezistence, *Rlm3* a *Rlm7*, korespondující s geny virulence *AvrLm3* a *AvrLm7*. Identifikace nové specifické interakce mezi *L. maculans* a *B. napus* umožňuje detekci dalšího nového domnělého specifického genu rezistence, *Rlm9*. Geny rezistence byly zmapovány ve dvou genomických regionech, na vazbových skupinách LG10 a LG16. Seskupení pěti *Rlm* genů rezistence se zřejmě nalézá na LG10. Vztah mezi těmito geny specifické rezistence a jejich potencionální role v rezistenci dospělých polních rostlin je

diskutovatelná. Tyto dva regiony, nesoucí *Rlm*, nekorespondují s majoritním QTL pro “Darmor“ kvantitativní rezistenci (Delourme et al., 2004).

Geny rezistence v různých odrůdách, jako je například Maluka, zmapovány na N7 (Rimmer et al., 1999) naznačují, že jednoduchý gen (nebo genový klastr) kontrolující rezistenci k *phoma lingam* u *B. napus*, byl široce využíván jako komponent rezistence, používaný ke kontrole odolnosti u odrůd řepky olejky/canoly. Zdá se, že tento gen je stejný jako *Rlm4*, u kterého bylo zjištěno, že je obsažen ve francouzské odrůdě Major, dříve zmapovaným na vazbové skupině 6 Ferrierou et al. (1995) a je součástí australských odrůd, zahrnujících Maluku (Rouxel et al., 2003).

Již dříve objevené geny rezistence u různých odrůd řepky: *LEM1* (Major), *LmFr1* (Crésor), *LmR1* (Shiralee), *cRLMm* (Maluka), a *aRLMrb* (RB87-62) byly geneticky zmapovány (Rimmer et al., 1999). Je zajímavé, že všechny tyto geny jsou lokalizovány na vazb. Sk.6 (Ferreira et al., 1995), která koresponduje s vazbovou skupinou N7 u Sharpe et al. (1995). V současnosti není jasné zda N7 geny obsažené v těchto odrůdách a šlechtěných liniích jsou či nejsou alelické, ale je jisté, že geny *LepR1* a *LepR2* se od těchto genů liší. Delourme et al. (2004) poukázal na to, že pět nezávislých genů rezistence vůči *L. maculans* (*Rlm1*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* a *Rlm9*) je lokalizováno v intervalu 35-cM na vazbové skupině DY.10 či ekvivalentní. Rouxel et al. (2003) dokázal, že cv. Maluka obsahuje *Rlm4* DY.10, musí být tudíž ekvivalentní N7 (Yu, Lydiate et Rimmer, 2005).

Wretblad et al. (2003) zjistil, že *Lm1* je pravděpodobně členem větší skupiny příbuzných genů, přítomných u různých druhů rostlin. Většina z nich má neznámou funkci, ale homologie mezi *Lm1* a genem zodpovědným za vznik hlízek u *Lotus japonicus* naznačuje netušenou vazbu mezi obrannými a symbiotickými cestami.

2.3.4.

Genetika patogenity

Parazitické mikroorganizmy jsou vybaveny genetickou informací, která jim umožňuje parazitaci. Ta je lokalizována v jádrech buněk nebo jejich funkčních ekvivalentech (nukleotidech) a v cytoplazmě (Lebeda, 1988).

V porovnání s více specializovanými houbovými patogeny, pro které je parazitizmus vázán se ztrátou genů, korespondujících s nepotřebnými funkcemi jako je sexuální reprodukce či kompetice s jinými mikroby v prostředí je *Leptosphaeria maculans* unikátní ve své schopnosti vyvinout rozdílné životní techniky. V důsledku toho si pravděpodobně udržuje četné geny, potřebné pro saprofytický život (získávání živin, kompetice s půdní florou, atd.), nekrotrofický parazitizmus (toxiny, degradační enzymy, atd.) a “skrytý“ mezibuněčný růst (suprese rozpoznání rostlinou anebo potlačení obranných odpovědí rostliny). Tyto rozmanité životní rysy rovněž naznačují vysoký stupeň plasticity v otázkách získávání živin a dalších nároků (Rouxel et al., 2003a).

2.3.4.1.

Genetická variabilita patogena

Dědičné změny patogenity závisí na vnitřních a vnějších faktorech. Z vnitřních faktorů ovlivňuje variabilitu především intenzita a způsob reprodukce patogenů (asexuální a sexuální), z vnějších faktorů zejména různé mutageny (Bartoš, 1979).

Zákonitosti řídící genetickou variabilitu patogena ovlivňují vznik nových ras, schopných napadat i odrůdy dříve odolné.

Fyziologickou rasou rozumíme takový izolát parazita, který se od ostatních izolátů daného druhu liší schopností napadat hostitelské odrůdy diferenačního sortimentu. Nové rasy patogenů vznikají sexuálními a somatickými (asexuálními) mechanismy a jejich selekci a rozšíření ovlivňují geny rezistence zastoupené v populaci, jakož i konkurenční schopnost jednotlivých ras, podmíněná dalšími geny (Lebeda, 1988).

Na variabilitě fytopatogenních hub se podílí především **sexuální proces, mutace, heterokaryoze, parasexuální cyklus a cytoplazmatická dědičnost.**

Při sexuálním procesu vznikají nové rasy křížením různých ras či autogamizací heterozygotních ras. Při křížení různých ras se kombinují alely genů patogenity obou rodičů podle Mendelových zákonů dědičnosti (Bartoš, 1979). Vzhledem k recesivitě genu patogenity resp. genu virulence, se jeho patogenita neprojevuje

v heterozygotním stavu, ale až když křížením či autogamizací vzniknou recesivní homozygoti.

2.3.4.2.

Patogenní skupiny

Izoláty *L. maculans* jsou běžně řazeny do dvou skupin, jedna je označována jako agresivní či vysoce virulentní, druhá jako neagresivní či příležitostně virulentní (Koch et al., 1989). Pérès et al. (1999) zkoumal 104 izolátů *L. maculans* a ze svých výsledků potvrdil existenci dvou patogenních skupin (TOX+ a TOX⁰) a tří podskupin TOX⁰, nazvaných NA1, NA2 a NA3. Zdálo se, že intenzita jejich projevu závisela na geografickém umístění či roční době, kdy byly vzorky sebrány.

Howlett et al. (1999) poukazuje na to, že se tyto dva kmeny *L. maculans* zdají být dvěma různými taxony, které se pouze stejně jeví pod mikroskopem, o čemž se zmiňuje i Yu et al. (2002), který popisuje dva velmi blízké druhy, a to *Leptosphaeria biglobosa* a *L. maculans*. *L. biglobosa* je obecně známa jako B-skupina či TOX⁰ *L. maculans*, přičemž se jí pouze podobá. *L. maculans* byla dříve nazývána A-skupinou či TOX+. *L. biglobosa* je také patogen řepky olejky, i když symptomy v Aglii běžně nemívají ničivý účinek na výnos.

Izoláty *L. maculans* byly také rozděleny do čtyř patogenních skupin (PG-pathogenicity group 1,2,3,4), podle odlišné virulence k semenáčkům *B. napus* odrůd Westar, Quinta a Glacier (Koch et al., 1991; Mengistu et al., 1991). Neagresivní izoláty jsou řazeny do PG1 a agresivní mohou být rozděleny do PG2, PG3 a PG4. Izoláty, které jsou kompatibilní (virulentní/náchylná: avr/rlm) s cv. Westar, a které poskytují inkompatibilní (avirulentní/rezistentní: Avr/Rlm) fenotypovou interakci s cv. Quita a Glacier, jsou klasifikovány jako PG2 (přehled viz. tab.2.3.). PG3 jsou virulentní ke cv. Westar i Glacier, ale avirulentní ke cv. Quinta a konečně izoláty řazené do PG4 jsou virulentní ke všem třem odrůdám (Yu et al., 2005).

Genetická kontrola specifických interakcí PG3-Quinta a PG2-Glacier byla analyzována jak na straně patogena, tak na straně rostliny ve fázi děložního lístku. Na straně patogena byla prováděna křížení mezi izoláty PG3, PG4 a PG2, PG4. Na straně rostliny byla Quita a Glacier křížena s náchylnou ozimou odrůdou Score. Genetická kontrola specifické rezistence byla stanovena následnou

analýzou F₁, F₂ a testovacím křížením populací. Výsledky poukazují, že inkopatibilní interakce PG3-Quinta a PG2-Glacier byly zapříčiněny páry odpovídajících si genů avirulence-rezistence, tedy, *Avrlm-Rlml* a *Avrlm2-Rlm2*. Třetí gen avirulence *AvrLm3* může být zodpovědný za inkompatibilitu PG2 izolátů vůči Quintě (Ansan-Melayah et al., 1997).

tab. 2.3.

ano-kompatibilní reakce; ne-inkompatibilní reakce

<i>L.maculans</i>	Odrůdy canoly		
	Westar	Glacier	Quinta
Pathogenicity Group			
PG1	ne	ne	ne
PG2	ano	ne	ne
PG3	ano	ano	ne
PG4	ano	ano	ano

2.4.

Molekulární markery

2.4.1.

Charakteristika a typy molekulárních markerů

Použití genových markerů významně doplňuje různé klasické metody genetické analýzy. Pomocí DNA markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, kterou sledovaní jedinci nesou. Dříve byly jako molekulární markery používány především bílkoviny a jejich různé varianty, tzv. izoenzymy (Řepková et

Relichová, 2001). V současné době se však více využívají DNA markery, které jsou variabilnější a mohou pokrýt (charakterizovat) celý genom organismu. Na rozdíl od proteinových markerů nejsou tak významně ovlivněny prostředím, jinými slovy, není narušena jejich selektivní neutralita, což v některých případech nebývá splněno u isoenzymových markerů, na které může selekce působit buď přímo, nebo skrze geny vystavenými selekci, s nimiž bývají často ve vazbě (Bergmann, 1975).

DNA markery jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců či populací. Sekvence DNA se v genomu mohou vyskytovat jako jedinečné sekvence (single copy), či jako středně nebo vysoce repetitivní sekvence s rozličnou funkcí a významem (kódující, regulační a nekódující sekvence). Je prokázáno, že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (Chloupek, 1995). Kromě tohoto typu polymorfni DNA jsou v genomu obsaženy náhodné genomické sekvence většinou využívané v RFLP a RAPD analýzách (Bachmann, 1992).

Velkou výhodou DNA markerů je rychlost a spolehlivost determinace. Například v případě potřeby stanovení patogenního agens z vegetativního vzorku je zapotřebí při kultivačních metodách minimálně 2-3 týdnů. Při imunologických testech pak tato doba činí včetně přípravy vzorku cca 24 hodin, u polymerázové řetězové reakce je možno tuto dobu zkrátit na 2-4 hodiny. Rovněž v souvislosti s využíváním explantátových kultur pro uchovávání genofondu a přípravu sadebního materiálu bude nutná kontrola deklarovaných vlastností (Jankovský et Šmerda, 2003).

Z hlediska použité metody se DNA markery dělí na markery založené na polymerázové řetězové reakci - PCR (Saiki et al., 1985) a markery založené na hybridizaci DNA. Ty se vizualizují prostřednictvím hybridizace fragmentů DNA štěpené restrikcí enzymem se značenou sondou. DNA sonda je fragment DNA známého původu a sekvence. Ve druhé skupině jsou markery založené na *in vitro* amplifikaci určitých sekvencí DNA či lokusů prostřednictvím specifických i nespecifických primerů (krátkých nukleotidových sekvencí), za účasti termostabilního enzymu, DNA polymerázy.

2.4.1.1.

Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR

Jedná se o nejstarší skupinu molekulárních markerů. V současné době je nahrazována technikami odvozenými od PCR.

RFLP

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Botstein et al., 1980) je metodou založenou na porovnávání restrikčních fragmentů vzniklých štěpením odpovídajících úseků DNA.

V průběhu evoluce docházelo k bodovým mutacím. Tyto mutace lze odhalit štěpením genomové DNA restrikčními enzymy a elektroforetickým rozdělením obdržených fragmentů (White et Lalouel, 1988). Restrikčním enzymem je DNA endonukleáza, která rozpozná a štěpí specifickou kombinaci 4-8 nukleotidů, sekvenční motiv (Smith et Wilcox, 1970). Po porovnání počtu a velikosti fragmentů lze usuzovat na příbuznost analyzovaných genomů. Tyto fragmenty mohou být porovnávány přímo, nebo po provedení Southernovy hybridizace (Southern, 1975).

RFLP analýza je závislá na dostupnosti specifických sond (jednořetězcových většinou naklonovaných úseků DNA), získaných z rekombinantní genomové DNA knihovny či uměle nasyntetizovaných oligonukleotidových sekvencí určité části genomu. Tyto sondy musí být vybírány s ohledem na dostatečný polymorfismus cílových míst a jednoznačnost hybridizace. Ke značení sond se obvykle používá radioizotopů, ale nověji byla vypracována i řada neradioaktivních metod.

RFLP markery jsou kodominantní a umožňují určit, zda je vázaný znak přítomen u určitého jedince v homozygotním či heterozygotním stavu. Nevýhodou je vysoká výchozí koncentrace DNA potřebná pro restrikční štěpení a Southernovu hybridizaci.

Tato metoda je současně používána k identifikaci různých genotypů, včetně lidského, a je hojně používána v soudním lékařství nebo k určování paternity (Sambrook et al., 2001).

VNTR

VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats or Minisatellites* - variabilita počtu tandemových repeticí. Jeffreys (1985) dokázal, že některé *restriction fragment length polymorphisms* jsou způsobené VNTRs. Genomy některých organismů obsahují velká množství mnohonásobných (tandemových) opakování nukleotidových motivů. Tyto motivy se často nachází v nekódujících oblastech genomů, v těsné vazbě se strukturálními geny. Podle délky motivu a počtu jeho opakování lze tyto oblasti DNA rozdělit na: 1. satelity - oblasti 10^3 - 10^7 nukleotidů dlouhé, délka motivu 100 a více nukleotidů, 2. minisatelity - 10^2 - 10^5 dlouhé úseky, motiv sestávající z 10-100 nukleotidů a 3. mikrosatelity - délka do 10^2 nukleotidů, motiv 2-6 nukleotidů (Chambers et MacAvoy, 2000) U této metody může být hybridizace uskutečněna se sondami pro minisatelitové i mikrosatelitové sekvence (Weising et Kahl, 1997).

2.4.1.2.

Techniky založené na PCR (Polymerase chain reaction):

V případě těchto technik není třeba znát cílovou sekvenci DNA fragmentů. Rozdíl mezi metodami, spadajícími do této kategorie, spočívají v různých délkách a sekvencích použitých primerů, přísnosti PCR podmínek a metodou separace a detekce fragmentů (Karp et Edwards, 1997).

Podskupinu tvoří metody využívající náhodné (arbitrary) primery, které umožní zahájení syntézy nového řetězce DNA, i když párování s templátem DNA není zcela dokonalé. Byly nazvány MAAP - *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling* (Caetano-Anollés, 1991) a AAD - *Arbitrarily Amplified DNA*.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR umožňuje selektivně pomnožit určitý úsek DNA v bezbuněčném systému (*in vitro*). Jedinou podmínkou jejího použití je znalost sekvence v bezprostředním sousedství úseku DNA, který chceme pomnožit. Vlastní sekvence tohoto úseku však známá být nemusí. PCR reakce tedy umožňuje selektivně naamplifikovat určité oblasti genomu, pokud známe sekvence ležící u této cílové oblasti – *flanking*

sequences - tzv. primery. Primery jsou uměle nasyntetizované oligonukleotidy (10-30 bází dlouhé), které jsou komplementární k sekvencím na obou vláknech DNA. DNA polymeráza je schopna pouze prodlužovat už stávající dvoušroubovici, nemůže kopírovat předložené vlákno DNA kdekoliv. Prekurzory syntézy jsou deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs), ze kterých se syntetizuje polynukleotidový řetězec a přidáním termostabilního enzymu *Taq* polymerázy se stanou zárodkem pro syntézu nového vlákna. Poměr CG:AT v sekvenci primeru by měl být přibližně 1:1 a primery by neměly být mezi sebou komplementární, zejména na 3' konci, kde může překrytí dvou nebo tří bází způsobit vznik oligodimerů (tzv. primer misspairing), zejména při nadbytku primeru. Celá reakce se sestává z malého množství vyizolované DNA (1-500ng), dNTPs, reakčního pufru a polymerázy. Namnožení DNA se dosahuje cyklickou změnou teplot reakčního roztoku v termocyleru. Počáteční teplota 92-95°C denaturuje dvoušroubovici DNA do jednořetězcových molekul. Další teplotní úsek podpoří přisednutí primerů ke komplementárním sekvencím (teploty annealingu se mohou lišit, přibližné rozmezí je 35-60 °C). Zahřátím na 72°C je spuštěna enzymatická reakce - elongace a dojde k zabudování volných dNTPs do nově vznikajícího řetězce podle templatové DNA. Tyto tři kroky se dále cyklicky opakují (počet cyklů je většinou 30-40) a počet nasyntetizovaných sekvencí přibývá exponenciální řadou.

RAPD

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams et al., 1990) je metoda využívající PCR, založená na možnosti cyklické amplifikace DNA fragmentů. Při RAPD jsou používány náhodně generované krátké primery o délce 6-10 nukleotidů. Tato délka je na dolní hranici použitelnosti a zvyšuje pravděpodobnost, že v genomu, o němž nejsou k dispozici žádné sekvenční informace, bude nalezeno místo s alespoň částečnou homologií. Během reakce dochází k amplifikaci řady produktů lišících se délkou a interním nukleotidovým složením. Zájem se upírá jen na to, který z primerů vykazuje u studovaných vzorků polymorfni pattern. Rozdíl oproti klasické PCR je ten, že se používá vždy jen jeden primer, který přisedne k homologním místům v protilehlých řetězcích dvoušroubovice. Základní podmínkou amplifikace úseku takto vymezeného je vhodná vzdálenost obou míst. Ta je závislá na podmínkách

reakce, zpravidla nepřesahuje 2000 bp. Frekvence alel jsou spočítány z přítomnosti či nepřítomnosti konkrétních amplifikovaných produktů, které jsou ve většině případů elektroforeticky separovány na agarózovém gelu. Vizualizace se tedy většinou provádí pomocí ethidium bromidu.

Ztráta sekvence komplementární k primeru (např. pouhou změnou 1 báze) má za následek absenci amplifikovaného úseku na gelu. Teoreticky se heterozygoti mohou od homozygotů odlišovat třeba jen intenzitou pruhu daného úseku, což není spolehlivý fenotypový znak. Někdy se stává, že se na gelu objeví “falešné” pruhy, které mohou zkreslit výsledky (Riedy et al., 1992). Důvodem jsou krátké délky primerů a nízké teploty, při nichž primery nasedají na DNA. Především teplota annealingu je oproti klasickému PCR nižší, kolem 34 °C. Počet cyklů je však vyšší - 40 až 45.

RAPD markery jsou představovány fylogeneticky konzervovanými produkty, specifickými pro jedince, náhodně rozloženými v genomu templátové DNA (Williams et al., 1990). RAPD markery jsou úspěšně používány v genetickém fingerprintingu při analýze různých druhů, původů a genetickém mapování. Jejich hlavní nevýhodou je dominantní charakter znaku (znak RAPD-proužek na gelu, se chová jako úplně dominantní genetický znak, není tedy možné odlišit heterozygota od dominantního homozygota), malá variabilita a reprodukovatelnost. Pokud se však tato metoda provádí za stále stejných podmínek a na stejném laboratorním vybavení jsou výsledky dobře srovnatelné a interpretovatelné. Komplikaci také představuje omezená použitelnost RAPD pro řešení otázek na úrovni vyšší než druhové, například stanovení příbuznosti v rámci rodu. Fakt, že dva fragmenty putují na gelu stejnou rychlostí (komigrují), nelze automaticky brát jako důkaz jejich homologie. Může se jednat o stejně velké fragmenty pocházející z naprosto odlišných oblastí genomu. Tyto nevýhody však nijak neomezují použití RAPD markerů pro studie genetické variability populací (Russel et al., 1993).

SCARs - *Sequence Characterised Amplified Regions*. SCARs analýza RAPD polymorfizmu ukazuje, že jednou z příčin RAPD polymorfizmu jsou chromozomální přeskupení jako inserce či delece. Proto se amplifikační produkty ze stejných alel heterozygota liší v délce a jsou viditelné jako přítomnost či absence pruhu v RAPD profilu. Polymorfnní RAPD markery transformované na SCAR markery mohou být

v komerčním šlechtění prospěšnější za předpokladu, že může být vyvinuta rychlá plus/minus esej k detekci prezenze či absence produktu (Paran et Michelmores, 1993).

AP - PCR

AP-PCR - *Arbitrarily Primed PCR*. Welsh a McClelland (1990) nezávisle vyvinuli metodu podobnou RAPD. Tato metoda náleží do kategorie amplifikačních metod používajících náhodné primery, není zde tedy třeba znát cílové sekvence DNA fragmentů. Primery jsou přibližně 15 nukleotidů dlouhé a podmínky amplifikace a elektroforézy jsou od metody RAPD odlišné.

DAF

DAF - *DNA amplification fingerprinting*. Jedná se o metodu PCR amplifikace s primery kratšími než 10 nukleotidů. Od standardního PCR se také odlišuje podmínkami amplifikace a vizualizace (obvykle polyakrylamidové gely). Je použit vždy jen jeden oligonukleotid a není potřeba znát žádné podrobnosti o genomu (Caetano-Annoles et al. 1991).

AFLP

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (Zabeau et Vos, 1993). Tato metoda kombinuje postupy jak RFLP (restrikční štěpení DNA), tak PCR (amplifikaci DNA). Jedná se o vysoce spolehlivou metodu, schopnou odhalit variabilitu na nejnižší taxonomické úrovni. Technická náročnost tohoto přístupu je však vysoká, vyžaduje radioaktivně či fluorescenčně značené primery, sekvenační elektroforézu či automatický sekvenátor. Fingerpriny vzniklé metodou fluorescenčně značených primerů jsou většinou těžko interpretovatelné. Byla vytvořena i metoda založená na chemoluminescentním značení (Lin et al., 1997). Postup se skládá z několika základních kroků: rozštěpení genomické DNA na fragmenty, následované ligací adaptorů a dále selektivní amplifikací fragmentů pomocí speciálních primerů. Dalším krokem je pak elektroforéza produktů a počítačová analýza. Spektrum fragmentů je možné získat bez předcházející znalosti

sekvence. Metoda je vhodná především k detekci polymorfizmu u blízce příbuzných genotypů.

Mikrosatelity, SSRs - STRs

SSRs - *Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats* (Tautz, 1989) - tandemová opakování krátkých motivů. Sekvence mikrosatelitů jsou obvykle polymorfni u různých ekotypů (Řepková et Relichová, 2001), a proto jsou vhodné jako molekulární markery (SSRs, STRs, SSLP - *simple sequence length polymorphism*). Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů. Jedná se o mono- až hexa-nucleotidové motivy (např. motivy $(GA)_n$, $(CAG)_n$) a celková délka lokusu obvykle nepřesahuje 100 bp. Mikrosatelitová sekvence má však svůj životní cyklus - vzniká, roste a mizí. Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu. Obvykle se tato polymorfni místa vyskytují v nekódujících oblastech, protože by měnila čtecí rámec odpovídajícího bílkovinného produktu. V rámci jednoho druhu či populace se mohou nalézat jedinci, kteří mají v určitém lokusu různě dlouhou mikrosatelitovou sekvenci. Na základě délky tedy lze rozlišit několik mikrosatelitových alel. Je možné zkoumat frekvenci jejich výskytu, stanovit podíl heterozygotů v populaci i stupeň podobnosti jednotlivých populací. Ke studiu mikrosatelitových alel je třeba znát sekvenci úseků, které s mikrosatelitem bezprostředně sousedí (*flanking DNA*). Sekvence primerů se získávají prohledáváním známých sekvencí obsažených v různých databázích.

Studiem mikrosatelitů lze odlišit heterozygota od homozygota, je k dispozici obrovský počet lokusů (izoenzymy dávají možnost studia asi jen 30 lokusů) a výsledky jsou reprodukovatelné. Na druhou stranu je určitou nevýhodou nutnost znalosti sekvence v sousedství mikrosatelitu. Rozdíl mezi analýzou mikrosatelitů a SSR - PCR spočívá v tom, že u prvního musíme znát sekvenci DNA bezprostředně sousedící s mikrosatelitem. SSR - PCR spočívá na rozhraní mezi specifickým PCR a PCR s náhodnými primery. Metodický přístup SSR - PCR umožňuje aplikaci u rostlin, u kterých není známa žádná informace o sekvenci DNA.

SSCPs

SSCPs - *Single Strand Conformational Polymorphism* (Orita et al., 1989) je metoda vhodná pro analýzu genů, zvláště při detekci bodových mutací a zjišťování DNA polymorfizmu. Je možné identifikovat heterozygotnost fragmentů DNA o stejné molekulové hmotnosti a je možné detekovat změny v několika nukleotidech.

2.4.2.

Stručný přehled markerů

Přehled a srovnání popsaných a dalších genetických markerů:

	ABUNDANCE	STUPEŇ POLYMORFIZMU	LOKUSOVÁ SPECIFITA	KODOMINANCE ALEL	REPRODUKOVATELNOST	MNOŽSTVÍ POTŘEBNÉ DNA	TECHNICKÉ NÁROKY
Allozymy	<i>nízká</i>	<i>nízký</i>	<i>ano</i>	<i>ano</i>	<i>vysoká</i>	-	<i>nízké</i>
RFLP	<i>vysoká</i>	<i>střední</i>	<i>ano</i>	<i>ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>velké</i>	<i>vysoké</i>
Minisatelity	<i>střední</i>	<i>vysoký</i>	<i>ne/ano</i>	<i>ne/ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>velké</i>	<i>vysoké</i>
PCR-sekvenování	<i>nízká</i>	<i>nízký</i>	<i>ano</i>	<i>ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>malé</i>	<i>vysoké</i>
RAPD	<i>vysoká</i>	<i>střední</i>	<i>ne</i>	<i>ne</i>	<i>nízká</i>	<i>malé</i>	<i>nízké</i>
Mikrosatelity	<i>vysoká</i>	<i>vysoký</i>	<i>ano</i>	<i>ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>malé</i>	<i>stř. nízké</i>
ISSR	<i>stř. vysoká</i>	<i>střední</i>	<i>ne</i>	<i>ne</i>	<i>stř. vysoká</i>	<i>malé</i>	<i>stř. nízké</i>
SSCP	<i>nízká</i>	<i>nízký</i>	<i>ano</i>	<i>ano</i>	<i>střední</i>	<i>malé</i>	<i>střední</i>
CAPS	<i>Nízká</i>	<i>stř. nízký</i>	<i>ano</i>	<i>ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>malé</i>	<i>stř. nízké</i>
SCAR	<i>Nízká</i>	<i>střední</i>	<i>ano</i>	<i>ano/ne</i>	<i>vysoká</i>	<i>malé</i>	<i>nízké</i>
AFLP	<i>Vysoká</i>	<i>střední</i>	<i>ne</i>	<i>ne/ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>střední</i>	<i>střední</i>
TaqMan	<i>nízká</i>	-	<i>ano</i>	<i>ne/ano</i>	<i>vysoká</i>	<i>malé</i>	<i>nízké</i>

<http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgp/research/molgen/overview.htm> (upraveno)

Využití DNA markerů:

DNA markery jsou široce využívány v zemědělství, biologii a medicíně, a to hlavně v těchto oblastech:

- Genetika a choroby člověka
- Systematika a taxonomie
- Populace, kvantitativní a evoluční genetika
- Šlechtění rostlin a zvířat
- Soudní a antropologické analýzy
- Mapování a analýzy genomu
- Prokazování paternity
- Soudní analýzy (soudní lékařství)
- Identifikace jedinců a populací

3. Materiál a metodika

3.1.

Materiál

1. Rostliny liniových odrůd: Capitol (6 vzorků)
Jesper (13 vzorků)
Mohican (8 vzorků)
Orkan (14 vzorků)

Popis odrůd:

Odrůda Jesper je povolena od roku 2001. Byla vyšlechtěna firmou Procosem SA a na českém trhu odrůdu zastupuje firma Cebeco Seeds. Jesper je polopozdní odrůda středního až vyššího vzrůstu. Poskytuje stabilní vysoký výnos v teplejší i chladnější oblasti. Vyniká vysokou plasticitou, odolností proti poléhání a odolností proti vyzimování. Předností této odrůdy je špičková **odolnost** proti houbovým chorobám, zvláště proti *phoma lingam*, kde dlouhodobě vykazuje nejlepší výsledky ze sortimentu zkoušených odrůd. Obsah oleje je střední.

Odrůda Capitol byla povolena v roce 1998. Udržovatelem odrůdy je firma Monsanto SAS a na českém trhu je zastoupená firmou SPZO Praha. Capitol je pozdní odrůda středního až vyššího vzrůstu, se střední až nižší odolností proti poléhání a vysokou odolností proti vyzimování. Rychlá regenerace porostu po zimě poskytuje dobré a vyrovnané výnosy ve všech oblastech pěstování. K pěstitelským rizikům patří nerovnoměrné dozrávání při chladnějším počasí a náchylnost k poléhání. U této odrůdy byl potvrzen gen rezistence vůči *P. lingam* **Rlm1** (Balesdent et al., 2002). Tato odrůda je pro svou plasticitu a intenzitu druhou nejrozšířenější odrůdou v České republice.

Mohican byl povolen v roce 2000. Tuto odrůdu vyšlechtila firma CPB Twyford a na českém trhu ji zastupuje společnost Saatbau Linz ČR. Jedná se o polopozdní odrůdu středního vzrůstu, která má výbornou odolnost proti vyzimování a střední odolnost proti poléhání. Mohican má vysoké výnosy ve všech oblastech pěstování

řepky, vyniká vyšší HTS a vysokým obsahem oleje v sušině semene. Pro pěstování jsou doporučovány především teplejší oblasti. Předností Mohicanu je také rychlá pokryvnost porostu na podzim a výborný zdravotní stav.

Odrůda Orkan byla povolena v roce 1998 a na českém trhu ji zastupuje firma Saaten Union. Tato polopozdní odrůda středního vzrůstu je vysoce odolná proti poléhání a odolnost proti vyzimování je spíše průměrná. Poskytuje vysoké a vyrovnané výnosy ve všech oblastech pěstování. K přednostem této odrůdy patří pěstitelská přizpůsobivost a vysoký stabilní výnos semene ve všech oblastech pěstování (<http://www.vpagro.cz/osivo>).

2. Rostliny získané regenerací z kultur mikrospor (pylových zrn) z F1 kříženců (Kučera et al. 1996), vždy náchylné rostliny s odolnou, odrůd Capitol, Jesper, Mohican, Orkan. Tato technika odvození R1 generace zajišťuje 100 % homozygotnost potomstva. Štěpný poměr v R1 generaci by měl být 1:1 (50 % homozygotů dominantních a 50 % recesivních). Velikost souboru vytvořených DH (dihaploidních) regenerantů byla 200 jedinců.

Veškerý rostlinný materiál byl dodán VÚRV Ruzyně.

3.2.

Metody

Pro odlišení náchylných (Mohican, Orkan) a odolných (Capitol, Jesper) genotypů byla provedena RAPD analýza (Williams et al., 1990). DNA použitá pro analýzu byla izolována z prvních pravých lístků směsného vzorku rostlin každé z odrůd. Byl proveden screening primerů z primerových sad Operon (Operon Technologies, Inc.). Primery odlišující náchylné a odolné genotypy byly dále testovány na R1 generaci mikrosporových regenerantů odvozených z F1 kříženců testovaných odrůd. U těchto vybraných primerů byla reakce minimálně dvakrát opakována. V případě regenerantů byla DNA izolována z každé rostliny individuálně.

3.2.1.

Extrakce DNA pro RAPD analýzu

DNA byla z děložních lístků izolována pomocí Insorb Spin Plant Mini Kitu. Pro extrakci byl rostlinný materiál nejdříve homogenizován pod tekutým dusíkem. Samotná DNA byla purifikována pomocí mikrokolon: na první mikrokoloně došlo k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé pak byla zachycena DNA. Následovalo její pročištění a promytí pufrům. Podrobný postup je popsán v protokolu uvedeném v přílohách.

Vzorky DNA byly uchovávány při teplotě -20°C .

3.2.2.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analýza

Reakční směs o objemu 25 μl měla následující složení:

- **15 μl H_2O** (sterilní)
- **2,0 μl dNTP's** (Mixture TaKaRa)
- **2,5 μl reakčního pufru** (10 \times PCR Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH = 8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100)
- **0,2 μl Taq polymerázy** (TaKaRa Taq DNA polymeráza TaKaRa TaqTM, konc. 5 jednotek/ μl)
- **4,0 μl primeru** (Operon Technologies, Inc.)
- **1,0 μl DNA**

V thermocycleru PTC 100 (MJ Research) proběhlo 45 PCR cyklů za následujících podmínek: 1 min **denaturace** 92°C , 2 min **annealing** při 35°C , a 3 min **polymerizace** při 72°C .

Použité primery a jejich sekvence:

OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	OPK-02	5'-GTCTCCGCAA-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	OPB-02	5'-TGATCCCTGG-3'	OPK-03	5'-CCAGCTTAGG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'	OPK-04	5'-CCGCCCAAAC-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	OPB-04	5'-GGACTGGAGT-3'	OPK-05	5'-TCTGTCGAGG-3'
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	OPB-05	5'-TGCGCCCTTC-3'	OPK-06	5'-CACCTTTCCC-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	OPB-06	5'-TGCTCTGCCC-3'	OPK-07	5'-AGCGAGCAAG-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'	OPK-08	5'-GAACACTGGG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'	OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'	OPK-09	5'-CCCTACCGAC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'	OPK-11	5'-AATGCCCCAG-3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'	OPK-12	5'-TGGCCCTCAC-3'
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	OPB-13	5'-TTCCCCCGCT-3'	OPK-13	5'-GGTTGTACCC-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	OPB-14	5'-TCCGCTCTGG-3'	OPK-14	5'-CCCCTACAC-3'
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	OPB-15	5'-GGAGGGTGTT-3'	OPK-15	5'-CTCCTGCCAA-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	OPB-16	5'-TTTGCCCGGA-3'	OPK-16	5'-GAGCGTCGAA-3'
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'	OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'	OPK-17	5'-CCCAGCTGTG-3'
OPA-19	5'-CAAACGTCCG-3'	OPB-18	5'-CCACAGCAGT-3'	OPF-01	5'-ACGGATCCTG-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'	OPB-19	5'-ACCCCCGAAG-3'	OPF-02	5'-GAGGATCCCT-3'
OPF-04	5'-GGTGATCAGG-3'	OPB-20	5'-GGACCCTTAC-3'	OPF-03	5'-CCTGATCACC-3'
OPF-05	5'-CCGAATTCCC-3'	OPF-06	5'-GGGAATTCCG-3'	OPF-07	5'-CCGATATCCC-3'
OPF-08	5'-GGGATATCCG-3'	OPF-09	5'-CCAAGCTTCC-3'	OPF-10	5'-GGAAGCTTGG-3'
OPF-11	5'-TTGGTACCCC-3'	OPF-12	5'-ACGGTACCAG-3'	OPF-13	5'-GGCTGCAGAA-3'
OPF-14	5'-TGCTGCAGGT-3'	OPF-15	5'-CCAGTACTCC-3'	OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'
OPF-17	5'-AACCCGGGAA-3'	OPF-18	5'-TTCCCGGGTT-3'	OPF-19	5'-CCTCTAGACC-3'
OPF-20	5'-GGTCTAGAGG-3'	OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'		

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

3.2.3.

Elektroforéza na agarózovém gelu

DNA fragmenty vzniklé štěpením restrikcními endonukleázami nebo PCR reakcí jsou běžně analyzovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. DNA fragmenty se pohybují v agarózovém gelu vlivem působení stejnosměrného elektrického pole. Negativně nabitě molekuly DNA se pohybují od katody (-) k anodě

(+). Dělení fragmentů je závislé na jejich velikosti - větší fragmenty se pohybují pomaleji, menší rychleji. Koncentrace agarózového gelu určuje velikost pórů, DNA fragmenty určité velikosti se pohybují agarózovými gely o různé koncentraci různě rychle. Pásky separovaných fragmentů jsou vizualizovány po obarvení fluorescenčním barvivem.

Složení použitého 1,5% gelu: **TBE pufr** (1x pracovní roztok: 89 mM Tris base, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA; 10x zásobní roztok: 108 g Tris base, 55 g boric acid, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 doplnit H₂O do 1000 ml), **agaróza**, **ethidium bromid** (na 150 ml gelu 10 μ l EtB o konc. 10 mg/ml).

PCR produkty (+ 1/6 loading pufr: 0,25% bromfenolová modř, 40% sacharóza, celkový objem byl 20 μ l) byly rozděleny elektroforézou (PS250-2). Prvních 30 minut bylo napětí el. pole 30 - 40 V, na další 2,5 až 3 hodiny bylo napětí zvýšeno na 60 - 70 V. DNA fragmenty byly vizualizovány pod UV světlem transluminátoru (Ultra + Lum, Biotech).

4. Výsledky

K nalezení oblasti výskytu genů rezistence k fomové hnilobě byla použita technika RAPD, pomocí které byly u řepky již dříve identifikovány markery obsahu kyseliny linolové/olejové (Hu et al., 1999), desaturace kys. linolové (Somers et al., 1998) či marker genu zodpovědného za koncentraci kys. linolenové v řepce (Tanhuanpaa et al., 1995).

U všech čtyř odrůd bylo testováno 73 primerů z řady Operon a byly hledány ty, které by měly u dvojice odolných odrůd monomorfní charakter, ale vykazovaly polymorfismus oproti dvojici náchylných. U potomstva vzniklého vždy křížením odolné odrůdy s náchylnou pak byly testovány pouze ty primery, které se osvědčily v testování rodičů.

4.1.

Selekce primerů

Vybrané nesespecifické primery byly nejprve pomocí RAPD testovány na rodičovské generaci u všech čtyř odrůd. Rozdílná RAPD spektra rozlišující dvojici náchylných (Mohican a Orkan) a odolných odrůd (Capitol a Jesper) byla patrná u produktů amplifikace s primery OPA 15, OPB 2, OPF 13 a především pak s OPA 14 a OPK 2.

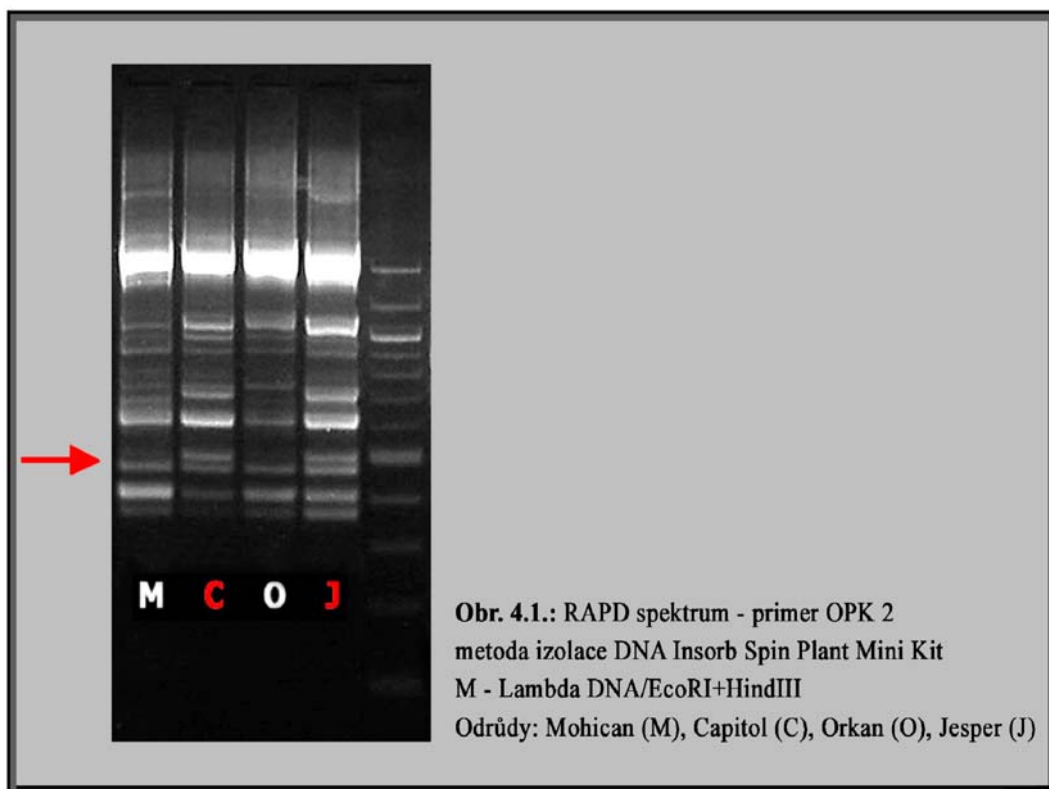
Za použití primeru OPK 2 byly u odolných odrůd jasně viditelné dva pruhy v oblasti velikostí okolo 500 pb, zatím co u náchylných byl viditelný pruh pouze jeden (viz obr. 4. 1.). Při opakování byl však rozdíl mezi spektry náchylných a odolných odrůd mnohem méně znatelný.

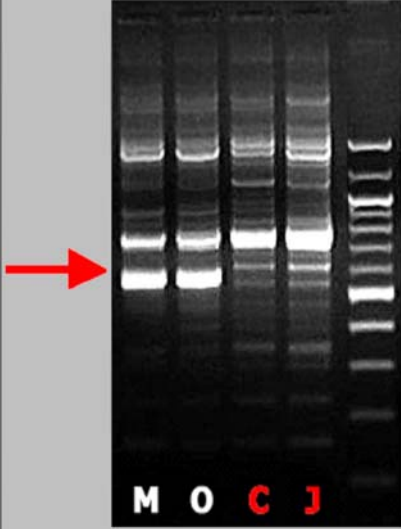
Použitím primeru OPA 14 (obr. 4. 2.) bylo dosaženo velmi pěkného a jasného spektra, kde je možné dobře rozlišit dva slabé pruhy v oblasti 600-700 pb charakterizující odolné genotypy. U genotypů náchylných je naproti tomu viditelný jen jeden silný pruh. I když se při opakování bohužel neamplifikoval výsledný produkt ze vzorku odrůdy Capitol, zbylé náchylné genotypy (Mohican, Orkan) i

odolný (Jesper) byly v RAPD spektru jasně znatelné (obr. 4. 3.), stejně jako u předešlého.

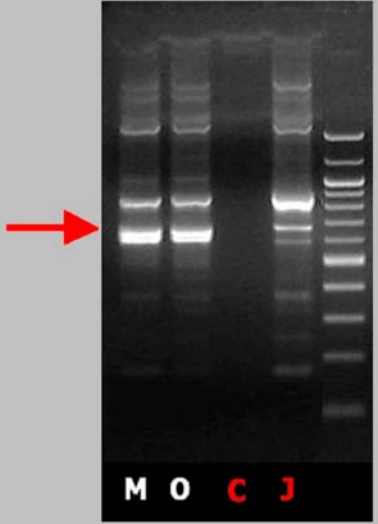
V případě ostatních zmíněných primerů (OPA 15, OPB 2, OPF 13 a OPF 15) byla spektra většinou málo zřetelná (obr. 4. 4.) a při opakování nebylo možné dosáhnout dvakrát stejného výsledku.

Zajímavé bylo výsledné spektrum za použití primeru OPK 12. Tento primer zřetelně odlišoval Orkan a Jesper od odrůdy Mohican a Capitol. Vzhledem k tomu, že všechny čtyři odrůdy vykazují podobné vlastnosti, srovnatelné úrovně odolností (kromě odolnosti vůči *L. maculans*), je možné bez podrobnějšího zkoumání pouze spekulovat s jakým znakem by mohl být asociován tento marker.

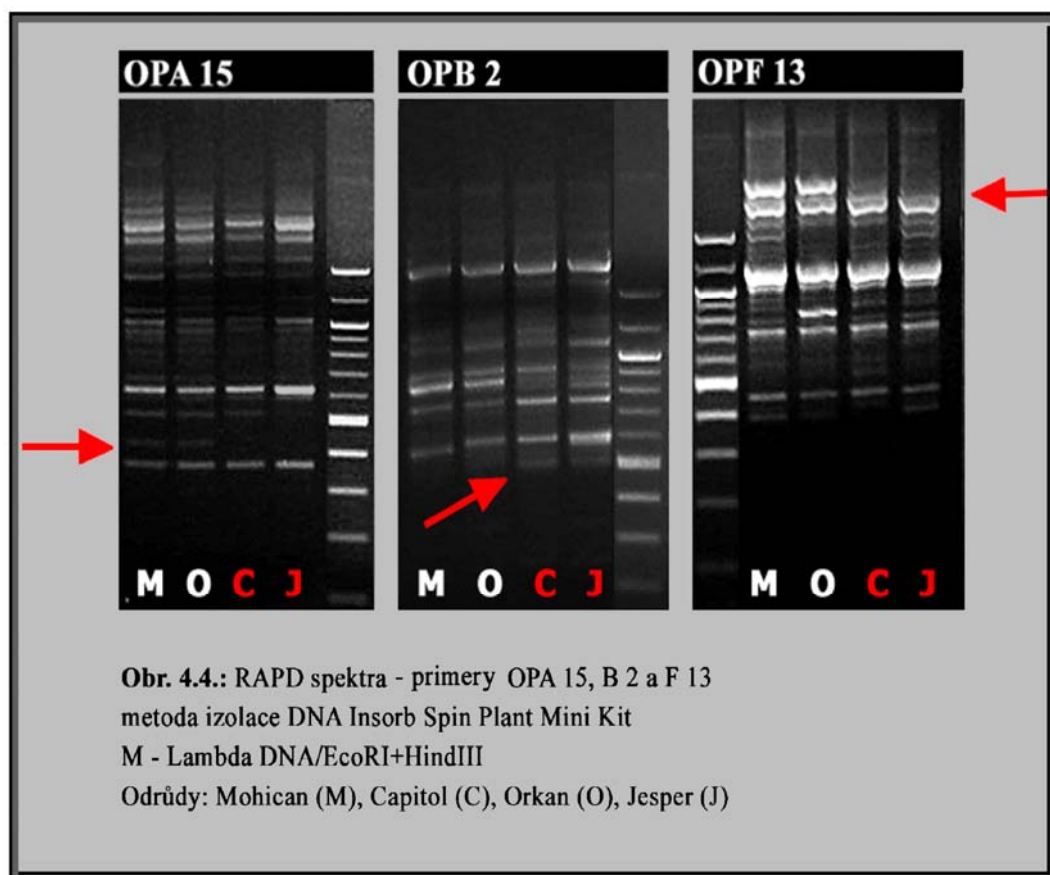




Obr. 4.2.: RAPD spektrum - primer OPA 14
 metoda izolace DNA Insorb Spin Plant Mini Kit
 M - Lambda DNA/EcoRI+HindIII
 Odrůdy: Mohican (M), Capitol (C), Orkan (O), Jesper (J)



Obr. 4.3.: RAPD spektrum - primer OPA 14, opakování
 metoda izolace DNA Insorb Spin Plant Mini Kit
 M - Lambda DNA/EcoRI+HindIII
 Odrůdy: Mohican (M), Capitol (C), Orkan (O), Jesper (J)

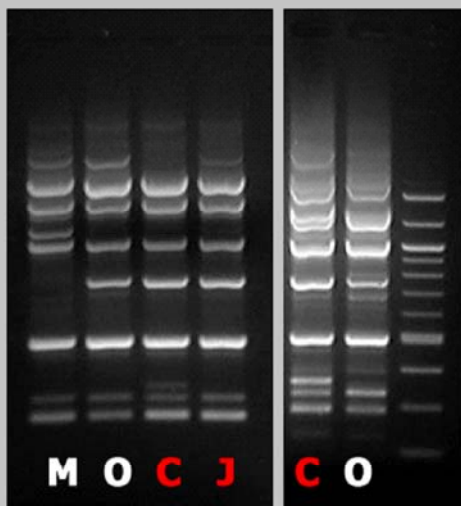


4.2.

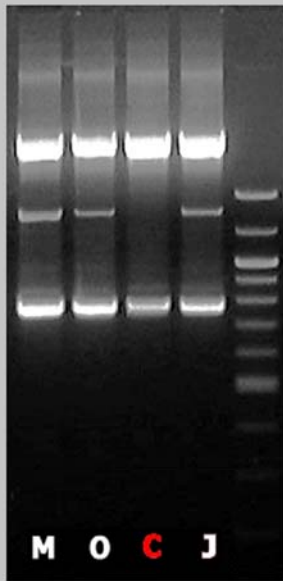
Primery odlišující Capitol

Odrůda Capitol od ostatních odrůd vykazovala nejčastěji odlišné spektrum fragmentů. Faktem je, že při srovnání charakteristik jednotlivých kovariant je to právě Capitol, který se liší nejvíce, i když ne výrazně, což bylo vzhledem k cíli žádoucí. Capitol je také jediná z vybraných odrůd, u které byl potvrzen gen rezistence a to Rlm1 (Balesdend et al., 2002), z toho důvodu na ní byla zaměřena větší pozornost.

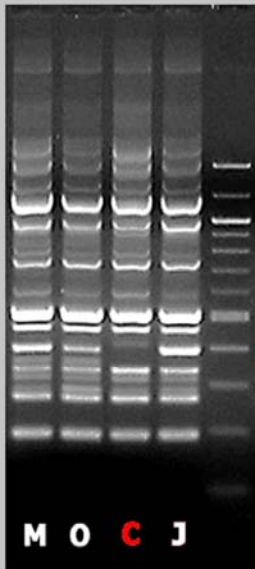
Čtyři primery - konkrétně OPA 8, 9, 16 a OPF 16, generovaly spektrum fragmentů, které odlišovalo Capitol od ostatních tří kultivarů. Opakovatelnost byla však sporná - ukázka s primerem OPA 16, který dosáhl i v druhém kole testování obdobného spektra (obr. 4. 5.). Spektra vzniklá za pomoci primerů OPF 16 a OPA 9 jsou zobrazeny v obr. 4. 6. a 4. 7.



Obr. 4.5.: RAPD spektra - primer OPA 16 (1 opakování)
 metoda izolace DNA Insorb Spin Plant Mini Kit
 M - Lambda DNA/EcoRI+HindIII
 Odrůdy: Mohican (M), Capitol (C), Orkan (O), Jesper (J)



Obr. 4.6.: RAPD spektrum - primer OPF 16
 metoda izolace DNA Insorb Spin Plant Mini Kit
 M - Lambda DNA/EcoRI+HindIII
 Odrůdy: Mohican (M), Capitol (C), Orkan (O), Jesper (J)



Obr. 4.7.: RAPD spektrum - primer OPA 9
 metoda izolace DNA Insorb Spin Plant Mini Kit
 M - Lambda DNA/EcoRI+HindIII
 Odrůdy: Mohican (M), Capitol (C), Orkan (O), Jesper (J)

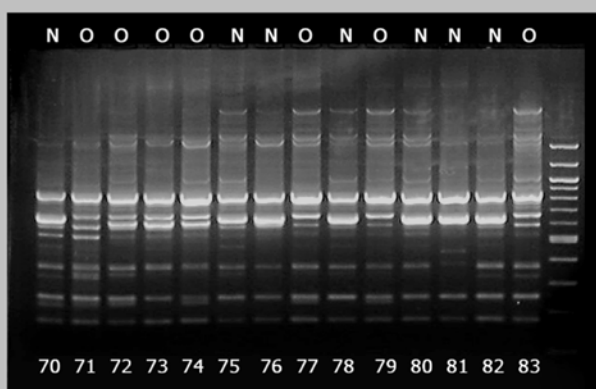
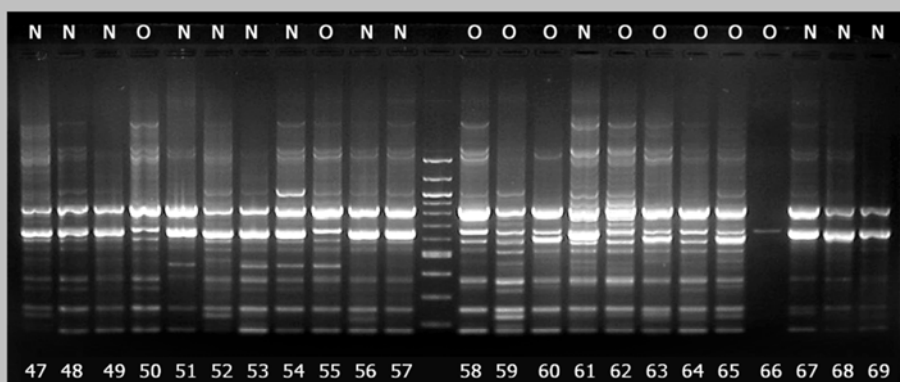
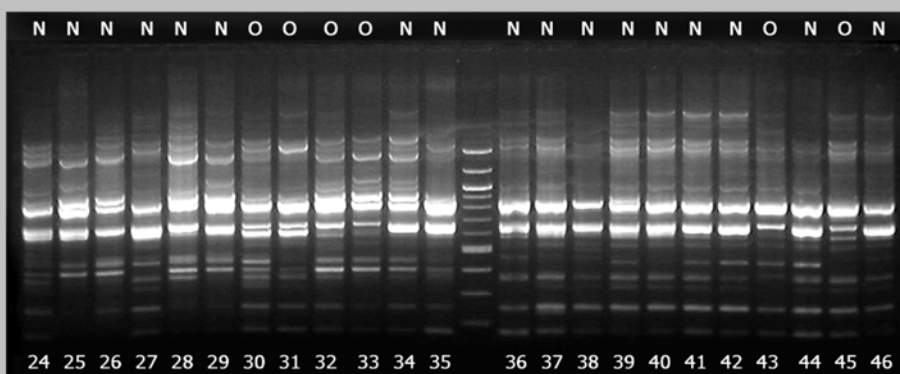
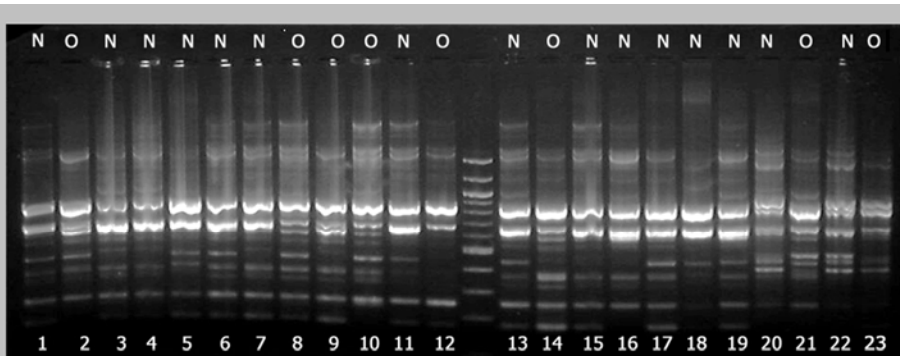
4.3.

Ověření segregace markeru v R1 generaci

Vzhledem k tomu, že pro testování byla použita populace vzniklá pylovou embryogenezí z F1 populace po křížení (vždy náchylné odrůdy s odolnou, viz kapitola materiál), byla zaručena 100% homozygotnost potomstva. RAPD markery jsou dominantního charakteru (Williams et al., 1990), proto byl předpokládán štěpný poměr v R1 generaci 1:1, tj. 50% dominantních a 50% recesivních homozygotů.

Na 83 rostlinách R1 potomstva byly testovány primery osvědčené u rodičovských jedinců (OPA 14, 15, OPB 2, OPF 13, 15 a OPK 2) a u části potomstva pak primery, které odlišovaly Capitol (OPA 8, 9, 16 a OPF 16).

Ve štěpící populaci vykazoval jako jediný segregaci primer OPA 14 (obr. 4. 8.). S učitou odchylkou danou kvalitou zobrazení spektra bylo tedy možné rozeznat jedince nesoucí nalezený marker rezistence od náchylných.



Obr. 4.8.: RAPD spektra - primer OPA 14
 metoda izolace DNA Insoorb Spin Plant Mini Kit
 M - Lambda DNA/EcoRI+HindIII
 83 vzorků rostlin mikrosporových regenerantů z F1
 kříženců testovaných odrůd
 Rozpis číslování vzorků viz. tabulka níže

Vzorky č.	rodičovské odrůdy
1 - 30	Jesper x Orkan
31 - 38	Mohican x Capitol
39	Orkan x Jesper
40 - 41	Orkan x Capitol
42 - 57	Capitol x Orkan
58 - 80	Jesper x Mohican
81 - 83	Capitol x Orkan

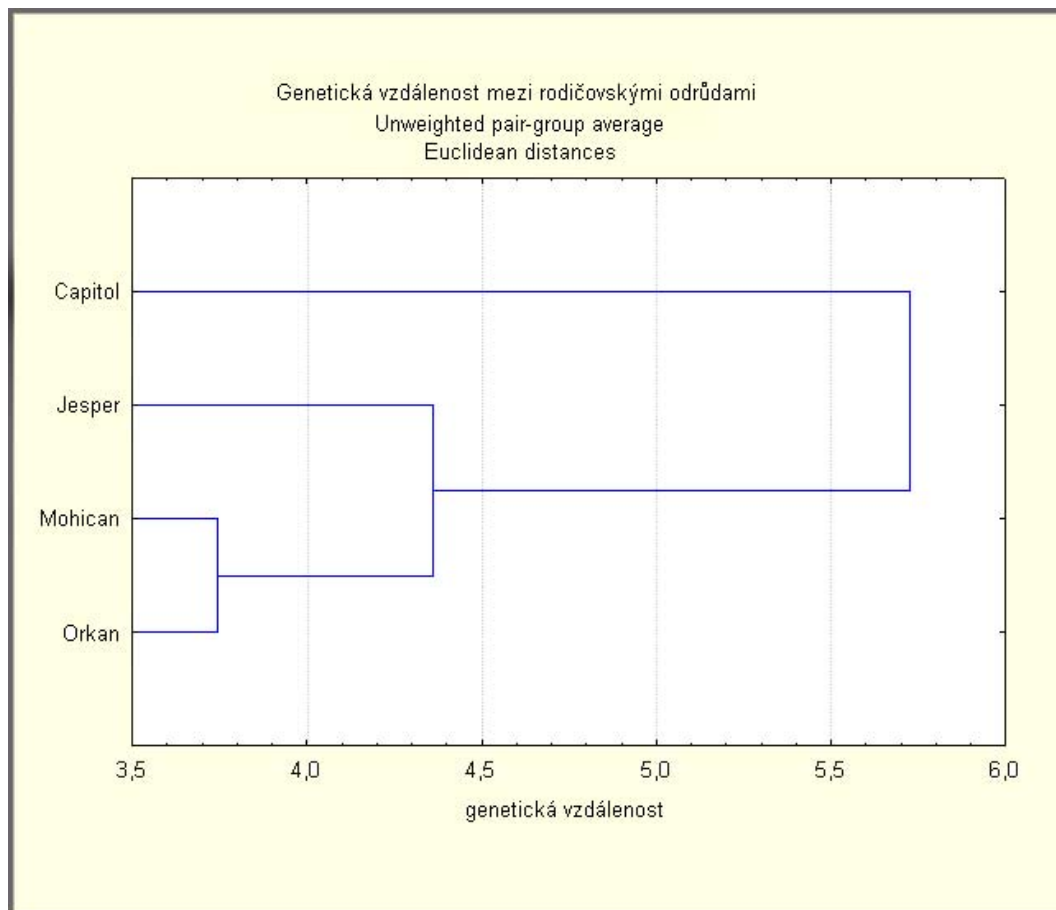
4.4.

Clusterová analýza

Data získaná z variabilních spekter RAPD byla použita pro odvození genetické vzdálenosti zkoumaných odrůd pomocí clusterové analýzy v programu Statistika 6.0.

Byly vypočítány koeficienty podobnosti každého vzorku se všemi ostatními a algoritmy pro genetické vzdálenosti. Pomocí clusterové analýzy byla na základě výpočtů seskupena podobná spektra a výsledky byly zobrazeny ve formě dendrogramů (viz obr. 4. 9.).

Výsledný dendrogram naznačuje vzájemnou genetickou podobnost náchylných odrůd (Mohican, Orkan) a dle očekávání zobrazuje odrůdu Capitol oproti ostatním třem odrůdám jako nejvíce geneticky odlišnou.



Obr. 4. 9.: Dendrogram zobrazující genetické vzdálenosti mezi jednotlivými odrůdami

4.5.

Inokulační test

Pro stanovení společné segregace markeru se skutečnou rezistencí (fenotypem) byl proveden inokulační test na stejných rostlinách mikrosporových regenerantů odvozených z F1 kříženců, které byly použity pro genetické analýzy. Pro potvrzení faktu, že nalezený marker je skutečně asociován s odolností vůči *P. lingam* bylo nezbytné provést srovnání genetických dat s fenotypem. Testy proběhly na pracovišti VÚOL Opava pomocí umělých infekcí.

Rostliny mikrosporových regenerantů z F1 kříženců donorových rostlin byly inokulovány v rozdílných vývojových fázích. Infekce byla provedena, pokud to bylo možné, na nejvyšší palisty. V případě, že rostliny neměly vytvořený stonek s palisty,

byly infikovány pravé listy. Na 1 rostlinu bylo provedeno 6 vpichů inokula, každý vpich byl vyhodnocen separátně. Hodnocení bylo provedeno 14 dnů po inokulaci.

Rozdíly mezi rostlinami nebyly velké a ani infekce se neprojevila příliš rozdílnými příznaky. Okraje kolem vpichů byly pouze mírně zažloutlé nebo na počátku nekrotizace. Takové příznaky byly hodnoceny stupněm 2. V případě, že k nekrotizaci nedošlo a pletiva kolem poranění byla neporušená, byly tyto příznaky hodnoceny stupněm 1. Vyšší stupně nebyly použity, protože rozsáhlejší příznaky poškození pletiv se nevyskytly. Průměrné napadení (Disease index) bylo vypočítáno jako vážený průměr získaných hodnot (viz tab. 4.10.). Mezi napadením rostlin bylo možné nalézt rozdíly, byly však minimální a je třeba zkontrolovat, zda nedochází k disproporcím u rostlin stejného původu.

Po získání semen fertálních rostlin bude vhodné test zopakovat a provést ho v řádném termínu na děložních listech.

Tab. 4.10.: Srovnání výsledků inokulačního testu s výsledky genetických dat. Shoda je vyjádřena tmavě šedým pozadím. N = náchylná, O = odolná

č. vzorku	křížení	výsledek gen. dat	výsledek inokulačního testu
1	VI x II	N	1.00
2	VI x II	O	1.00
3	VI x II	N	1.33
4	VI x II	N	1.00
5	VI x II	N	1.17
6	VI x II	N	1.33
7	VI x II	N	1.00
8	VI x II	O	1.00
9	VI x II	O	1.00
10	VI x II	O	1.00
11	VI x II	N	1.00
12	VI x II	O	1.00
13	VI x II	N	1.00
14	VI x II	O	neinfikováno
15	VI x II	N	- „ -
16	VI x II	N	- „ -
17	VI x II	N	- „ -
18	VI x II	N	- „ -
19	VI x II	N	- „ -
20	VI x II	N	- „ -
21	VI x II	O	- „ -
22	VI x II	N	- „ -
23	VI x II	O	- „ -
24	VI x II	N	- „ -
25	VI x II	N	- „ -
26	VI x II	N	- „ -
27	VI x II	N	- „ -
28	VI x II	N	- „ -
29	VI x II	N	- „ -
30	VI x II	O	- „ -
31	I x V	O	- „ -
32	I x V	O	- „ -
33	I x V	O	- „ -
34	I x V	N	- „ -
35	I x V	N	- „ -
36	I x V	N	- „ -
37	I x V	N	- „ -
38	I x V	N	- „ -
39	II x VI	N	- „ -
40	II x V	N	- „ -
41	II x V	N	- „ -
42	V x II	N	1.00

43	V x II	O	1.00
44	V x II	N	1.50
45	V x II	O	1.17
46	V x II	N	1.17
47	V x II	N	1.67
48	V x II	N	1.33
49	V x II	N	1.00
50	V x II	O	1.00
51	V x II	N	1.17
52	V x II	N	1.00
53	V x II	N	1.17
54	V x II	N	1.17
55	V x II	O	1.00
56	V x II	N	1.17
57	V x II	N	1.00
58	VI x I	O	1.00
59	VI x I	O	1.00
60	VI x I	O	1.00
61	VI x I	N	1.67
62	VI x I	O	1.00
63	VI x I	O	1.50
64	VI x I	O	1.33
65	VI x I	O	1.33
66	VI x I	O	1.00
67	VI x I	N	1.00
68	VI x I	N	1.00
69	VI x I	N	1.00
70	VI x I	N	1.00
71	VI x I	O	1.00
72	VI x I	O	1.00
73	VI x I	O	1.17
74	VI x I	O	1.33
75	VI x I	N	1.00
76	VI x I	N	1.17
77	VI x I	O	1.00
78	VI x I	N	1.17
79	VI x I	O	1.00
80	VI x I	N	1.17
81	V x II	N	1.33
82	V x II	N	1.17
83	V x II	O	1.33

I. Mohican	<i>náchylná</i>
II. Orkan	<i>náchylná</i>
V. Capitol	odolná

5. Diskuse

V posledních letech demonstrovala řada příkladů důležitost „high-density“ genetických map a úvodních genových studií pro identifikaci genetických markerů spojených s důležitými znaky plodin rodu Brassica. Moderní odrůdy jak ozimé tak jarní řepky nesou zdroje rezistence k *L. maculans* pocházející z A genomu. V různých fenofázích rostliny jsou však za rezistenci zodpovědné rozdílné geny (Zhu et al., 2003). I když je rezistence dospělých rostlin v polních podmínkách důležitou vlastností pro velkoprodukcí řepky, široký záběr variability patogena a nutnost polního testování komplikuje možnost vyhodnotit tuto rezistenci geneticky. Monogenní a polygenní dědičnost rezistence dospělé rostliny v polních podmínkách byla popisována mnoha autory (Cargeeg et Thurling, 1979; Sippell et al., 1991; Stringam et al., 1992; Dion et al., 1995; Ferreira et al., 1995; Pang et Halloran, 1996b; Pilet et al., 1998; Li et Cowling, 2003). Naproti tomu rezistence v časných stádiích vývoje rostliny (kotyledonová či ve fázi semenáčků) je obecně kontrolována jednoduchými dominantními geny a jedná se tedy o odolnost rasově specifickou. Přestože mnoho studií poukazuje na to, že se rezistence v časných stádiích a dospělosti nacházejí pod odlišnou genovou kontrolou, řada autorů zjistila významnou korelaci mezi oběma typy odolností (Newman et Bailey, 1987; McNabb et al., 1993; Bansal et al., 1994; Li et Cowling 2003). To by mohlo být způsobeno pevným sepětím genu kotyledonové rezistence s jedním nebo několika majoritními QTL rezistence v dospělosti rostliny konkrétní odrůdy či alelickými variacemi na single lokusu.

Gen rasově specifické kotyledonové rezistence Rlm 1, potvrzený i u zkoumané odrůdy Capitol (Balesdent et al., 2002), objasnil 70% variací rezistence dospělých rostlin ve francouzské odrůdě Maxol (Delourme et al., 2004). Silná korelace mezi rezistencí semenáčků a polní rezistencí australské odrůdy canoly Maluca napomohla urychlit vývoj odrůdy Quantum pro polní podmínky západních oblastí Kanady (Stringam et al., 1995). Markery rezistence projevujících se v časných stádiích vývoje mohou tedy evidentně být velmi užitečným nástrojem k

urychlení šlechtitelských programů řepky. Výtěžek z nalezení takového markeru je však svým způsobem bohužel pouze dočasný, u kvalitativního založení rezistence se patogen při silnějším selekčním tlaku navozeným rozšířením rezistentní odrůdy velmi rychle přizpůsobí a jednoduchou mutací se gen virulence stává inkompatibilním ke genu rezistence a ten se tedy stává nefunkčním. U některých odrůd se vyskytuje větší množství single dominantních genů rezistence a u těchto by tedy měl být marker pravděpodobně déle využíván, neboť různé geny rezistence byly zmapovány na vazbových skupinách dvou genomických regionů - a to na LG16 a LG10, kde by se měl nalézat klastr pěti genů kontrolující kotyledonovou rezistenci (Delourme et al., 2004). Společný marker pro tuto oblast však není znám.

Větší množství studií, zabývajících se hledáním markeru rezistence k *L. maculans*, přesunuje svůj zájem především na mezidruhové hybridy B. napus/B-genom obsahující druhy, neboť vykazuje vysoký stupeň rezistence a tato se zdá být dosud trvalá. Markery pak slouží především k detekci B-genomové rezistence v hybridním potomstvu. Plieske et Struss (2001) například vyvinuli několik STS markerů rezistence a zjistili, že lokace genů odolnosti vůči fómě je v B. napus/B-genome rekombinantních liniích obdobná jako na A-genomu.

V této práci bylo použito 73 primerů k nalezení markeru fomové rezistence. V šesti případech vykazovaly primery polymorfismus mezi dvěma odolnými a dvěma náchylnými odrůdami, ale jen u jednoho primeru bylo dosaženo stejného spektra i v opakovaném screeningu. Tento fakt byl velmi důležitý, protože právě opakovatelnost byla u RAPD popsána jako sporná (Penner et al., 1993). Ve výsledku byl tedy nalezen jen jeden primer, který detekoval hledaný marker jak u zkoumaných odrůd, tak u smíšeného potomstva. Chevre et al. (1997) musel testovat 400 primerů k nalezení tří markerů hledaného genu rezistence v canole.

Jak bylo zmíněno, u odrůdy Capitol byl potvrzen gen Rlm1. Tento gen náleží ke skupině pěti genů, které by se měly nalézat na vazbové skupině LG10. Tato vazbová skupina koresponduje (dle Delourmovi studie (2004) založené na porovnání specifík genů rezistence a genů avirulence resp. virulence) s vazbovou skupinou LG6 Ferreiry et al. (1995) a tedy A-genomovou vazbovou skupinou N7, která se zdá být ekvivalentní (Ferreira et al., 1995; Parkin et al., 1995). Zajímavé je zjištění Mayerhofer et al. (2005), které naznačuje, že region genů rezistence je obsažen alespoň ve třech kopiích na A-genomu a zřejmě ve čtyřech kopiích na C-genomu rodu Brassica. Vzhledem ke shlukům R genů na zmíněných vazbových skupinách,

měl by být nalezený RAPD marker, získaný na základě amplifikace s primerem OPA14, schopen "detekovat" různé geny rezistence, jako je tomu u odrůdy Major, u které nejsou známy podrobné informace o genetickém založení rezistence k *L. maculans*.

Shoda genetické analýzy R1 regenerantů s fenotypem nebyla nijak výrazná. Nelze považovat za prokázané, že by marker segregoval s fenotypem. Shoda s fenotypem byla 47%. Celkově však toto vyhodnocení proběhlo na velmi malém souboru, i vzhledem k tomu, že část rostlin nebyla infikována. Také reakce rostlin na infekci byla málo intenzivní a všechny tyto faktory poněkud zkreslují výsledky společného vyhodnocení.

Co se týká slabé reakce na infekci, mohla být způsobena použitím nevhodných, slabých izolátů patogena. Dle zjištění Yu et al. (2005) dávala odrůda Quinta kompatibilní reakci (avrlm/rlm) s izoláty z patogenní skupiny tři a čtyři, naproti tomu inkompatibilní (Avrlm/Rlm) s izoláty PG 1 a 2. Ve smyly této studie byla tato odrůda rezistentní vůči izolátům PG skupin 1 a 2. Vzhledem k tomu, že odrůda Capitol, testovaná v této práci obsahuje gen Rlm 1 stejně jako odrůda Quinta, měla by být reakce se stejnými izoláty obdobná. Podrobnější informace o použitých izolátech bohužel není dostupná, ale při dalších testech by bylo vhodné uvedených závěrů využít, pokud tak nebylo učiněno nyní.

Za předpokladu, že by další testování, a to především srovnání RAPD spekter štěpící populace s fenotypovým testem na děložních lístcích vykazovalo shodu, mělo by být přistoupeno k dalšímu studiu vybraného RAPD produktu a vytvoření specifického SCAR markeru (Arnedo et al., 2002). Ze spektra RAPD pruhů bude vyříznut ten, který odlišuje náchylné jedince od odolných a tento produkt bude zaklonován. Dále bude následovat sekvenování produktu a vyhodnocení sekvencí, na jejichž základě budou odvozeny specifické primery (cca 25 okrajových bazí produktu). Tyto primery by měly amplifikovat už pouze jediný úsek - specifický marker odlišující odolné a náchylné jedince.

6. Závěr

Pomocí metody RAPD byly velmi dobře odlišeny odolné genotypy donorových rostlin od náchylných. Byla vytvořena sada RAPD spekter (DNA fingerprintingů), na jejímž základě byl odvozen marker pro rezistenci *k L. maculans*.

Mezi náchylným a odolným genotypem populace rostlin mikrosporových regenerantů z F1 kříženců testovaných odrůd byly ve většině případů znatelné rozdíly, ale markery s fenotypem přesně nesegregovaly, i když jak již bylo řečeno, rozdíly mezi fenotypovým projevem odolných a náchylných jedinců byly minimální. Nejvyšší shody bylo dosaženo po amplifikaci za pomoci primeru OPA 14, i když ani tento RAPD marker stoprocentně nerozlišoval odolné a náchylné jedince.

Na základě souboru získaných dat byly pomocí clusterové analýzy stanoveny genetické vzdálenosti mezi odrůdami, které velmi dobře kopírovaly známé znaky, resp. odlišnosti jednotlivých odrůd.

Po získání semen fertálních rostlin bude fenotypová zkouška zopakována a provedena v řádném termínu na děložních lístcích. Zejména toto je velmi důležité, neboť právě v tomto časném stadiu vývoje rostliny by se měly uplatňovat specifické geny kvalitativní rezistence.

Dalším krokem by mělo být vytvoření specifického markeru (SCAR markeru), za pomoci kterého by byli odlišitelní jedinci rostlin řepky náchylní k fomové hnilobě od jedinců rezistentních již v časně fázi ontogeneze.