

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra rostlinné výroby

Studijní program: M4101 T Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Diplomová práce

**Optimalizace metody PCR – RFLP pro detekci S – haplotypů u
řepky**

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

Autor diplomové práce: Pavlína Stuchlá

2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Optimalizace metody PCR – RFLP pro detekci S – haplotypů u řepky“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích dne 20. 4. 2007

Pavλίna Stuchlá

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph . D., Ing Janě Žaludové a Ing. Božence Kukulíkové za odborné vedení, obětavou pomoc a rady, které mi poskytli nejen při vypracování mé diplomové práce, ale i během celého studia.

Obsah

Obsah	1
Úvod.....	6
Literární přehled.....	8
Vznik řepky.....	8
Šlechtění řepky.....	8
Šlechtitelské cíle.....	9
Typy řepky	10
Systémy zabraňující opylování	11
Jaderná samčí sterilita	11
Typy jaderné samčí sterility	11
Transgenní pylová sterilita.....	11
Genově – cytoplazmatická sterilita	12
Cytoplazmatická sterilita.....	12
Autoinkompatibilita (AI) u řepky	13
Charakteristika SLG genu	14
Molekulární markery ve šlechtění řepky.....	15
Metody založené na amplifikaci nukleových kyselin	16
Metody PCR s cílem na určité sekvence a jednoduché lokusy.....	22
Materiál a metody	28
Rostlinný materiál	28
Metody	28
Izolace DNA.....	28
PCR reakce.....	28
Štěpení PCR produktů.....	29
PCR – RFLP genu SLG II.....	29
PCR – RFLP genu SLG I.....	29
Sekvenování	29
Klonování.....	29
Výsledky	30
Rozlišení jednotlivých alel genu SLGII metodou PCR - RFLP	30
AI linie Start – PCR-RFLP genu <i>SLG II</i> (<i>EcoR I</i>).....	30
AI linie Start a WRG – PCR-RFLP genu <i>SLG II</i> (<i>Afa I</i>)	31

AI linie Start a WRG – PCR-RFLP klonů genu SLG II (<i>Afa</i> I).....	31
AI linie WRG, Start a Tandem – PCR-RFLP klonů genu SLG II (<i>Eco</i> RI)	32
Spektrum odrůd – PCR-RFLP klonů genu SLG I (<i>Mbo</i> I)	33
Odíla, Global a Topas – PCR-RFLP klonů genu <i>SLG I (Mbo I)</i>	34
Global – PCR-RFLP klonů genu <i>SLG I (Mbo I)</i>	34
Klonování a sekvenování SLG genu.....	35
Diskuse.....	38
Závěr	41
Seznam použité literatury.....	42
Přílohy.....	46
Příloha 1	46
Izolace genomové DNA (Invisorb Spin Mini Kit – Invitex)	46
Příloha 2	47
Izolace plazmidové DNA (Invisorb Spin Plasmid Mini Kit – Invitex)	47
Příloha 3	48
Eluce fragmentů DNA z agarózového gelu (JETQUICK).....	48
Příloha 4	49
Klonování (Topo TA cloning for sequencing kit – Invitrogen).....	49
Příloha 5	50
Příprava tekutého LB media.....	50
příloha 6	51
Sekvenační reakce (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit – Beckman Coulter)	51
Příloha 7	52
Přečištění sekvenační reakce.....	52
Příloha 8	53
Restrikční štěpení PCR produktů.....	53
Příloha 9	54
PCR pro gen SLGII.....	54
Příloha 10	55
Příprava agarózového gelu.....	55

Úvod

Původní výskyt řepky olejné (*Brassica napus* L. var. *napus*) je vázán na Středomoří, kde se vyskytovaly i brukev zelná (*Brassica oleracea* L.) a řepice olejná (*Brassica campestris* L.). Řepka olejná je amfiallotetraploid s 38 chromozomy a vznikla křížením uvedených dvou druhů s diploidním počtem chromozomů. Řepka je řazena mezi brukvovité rostliny, dnešní odrůdy jsou fakultativně cizosprašné, cizosprašení se podílí ze 30 – 40%, je hmyzosubná, plodem řepky je dvouřadá šešule, která obsahuje 15 – 20 semen. Řepka má křovitý kořen a rozsáhlou kořenovou soustavu.

Nejvýznamnějším produktem řepky je řepkový olej a ztužený řepkový tuk. Řepka se používá pro výrobu olejů v oleochemii, dále pro výrobu bionafty, využívá se v krmivářství po extrakci oleje na pokrutiny a extrahované šroty.

Šlechtěním se podařilo, že se řepka dokázala zařadit mezi rostliny produkující kvalitní potravinářské oleje a začala konkurovat olejům slunečnicovým, palmovým a sojovým. Snížením obsahu sirných sloučenin – glukosinolátů – (GSL) se umožnilo využít zbytky v živočišné výrobě po extrahování oleje. Obsah glukosinolátů ale také souvisí s tím, že řepka je rostlina, která je díky tomu rezistentní k dřepčíkům (*Haltica oleracca*), nosatcům (*Ceutorhynchus assimilis*), krytonoscům a mnoha dalším škůdcům. Vzrostly také výnosové schopnosti vyšlechtěním nových odrůd, které se blížily v pokusných podmínkách na produkci 8 t semen, což je 3 t oleje z 1 ha. Olejnatost je nejméně 42%. Další zlepšení nastalo s využitím heterozního efektu u hybridních odrůd, ale zde zase došlo ke zvýšení obsahu glukosinolátů v porovnání s liniovými odrůdami. Nicméně limit nebyl překročen. Plocha, na které se nyní pěstuje řepka je v České republice dnes asi 300 tis. ha a předpokládá se zvýšení, pokud by se řepka pěstovala zejména pro bioethanol.

Šlechtěním řepky olejné se v České republice zabývá VÚRV v Praze Ruzyni, Výzkumný ústav olejin v Opavě a ještě několik dalších šlechtitelských stanic. Víceleté výsledky ukázaly, že především hybridní odrůdy poskytují jen o 3 až 4 procenta vyšší výnosy než liniové odrůdy při stejné pěstitelské technologii. Jako nejspolehlivější se ukázalo pěstovat odrůdy, které vykazují výnosovou stabilitu v různých ročnících. Jsou to např. Ontario, Jesper, Navajo, nově Californium, z hybridů Vectra. Při tvorbě hybridních odrůd dochází k produkci osiva z kontrolovaného křížení dvou komponent.

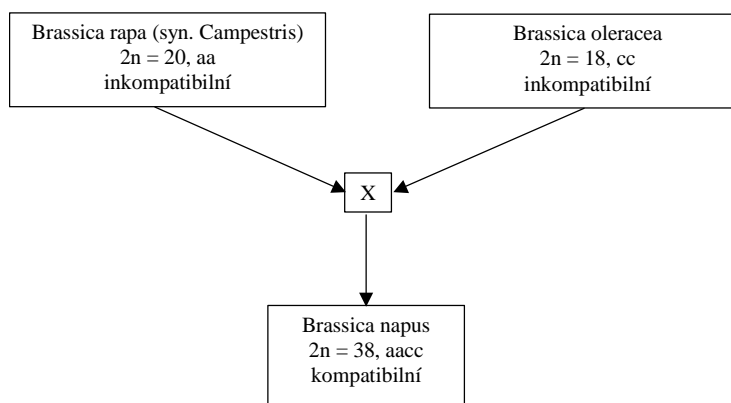
Veškeré potomstvo takového křížení je heterozygotní. Hybridní šlechtění je tím výhodnější, čím je vyšší heteroze a čím je větší hodnota specifické kombinační schopnosti ve šlechtitelském materiálu. Heteroze je biologický jev zvýšené vitality a produktivity F_1 generace po zkřížení geneticky rozdílných genotypů nebo linií. Požadavkem je však existence hybridního mechanismu, postupu, který vede ke kontrolované hybridizaci mateřského a otcovského materiálu a zisku hybridního osiva. Šlechtitelské firmy si stanovily několik cílů: Použít nové metody k testování kvality semen řepky, získat výchozí materiály odolné vůči chorobám, abiotickým podmínkám, zrychlit dobu tvorby linií a hybridů na bázi cytoplazmatické samčí sterility, odvodit DNA markery pro selekci výchozích šlechtitelských materiálů. Molekulární markery jsou využívány při sledování genů ve šlechtitelském procesu, pomocí nich se dají detekovat rozdíly mezi analyzovanými druhy., jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Výhodou molekulárních markerů je možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu, možnost sledování většího počtu požadovaných znaků.

Cílem mojí diplomové práce bylo využití metody PCR – RFLP pro detekci S – haplotypů (kombinace alel všech genů definující specifitu autoinkompatibilní reakce u řepky) a různých alel genu *SLG II*. Tento gen se podílí na autoinkompatibilní reakci u řepky. Autoinkompatibilita znamená, že se znemožní opylení rostliny vlastním pylem. Tyto autoinkompatibilní linie s různým S – haplotypem jsou využívány pro vyšší výnosy hybridní řepky i v polních podmínkách. Molekulární analýzy by mohly napomoci identifikaci autoinkompatibilních genotypů řepky, k identifikaci jednotlivých S – haplotypů jsou využívány právě *SLG* geny.

Literární přehled

Vznik řepky

Řepka (*Brassica napus*) je alotetraploid, který vznikl po spontánním křížení *B. rapa* (genom A) a *B. oleracea* (genom C). Genom řepky je tedy složený s obou těchto genomů a řepka má genom AACC. Řepka je autofertilní, i když je odvozená z diploidních inkompatibilních druhů (je znemožněno opylení vlastním pylem). Příčinou autofertility řepky mohou být defektní alely S – lokusu v genomu A i C (U 1935).



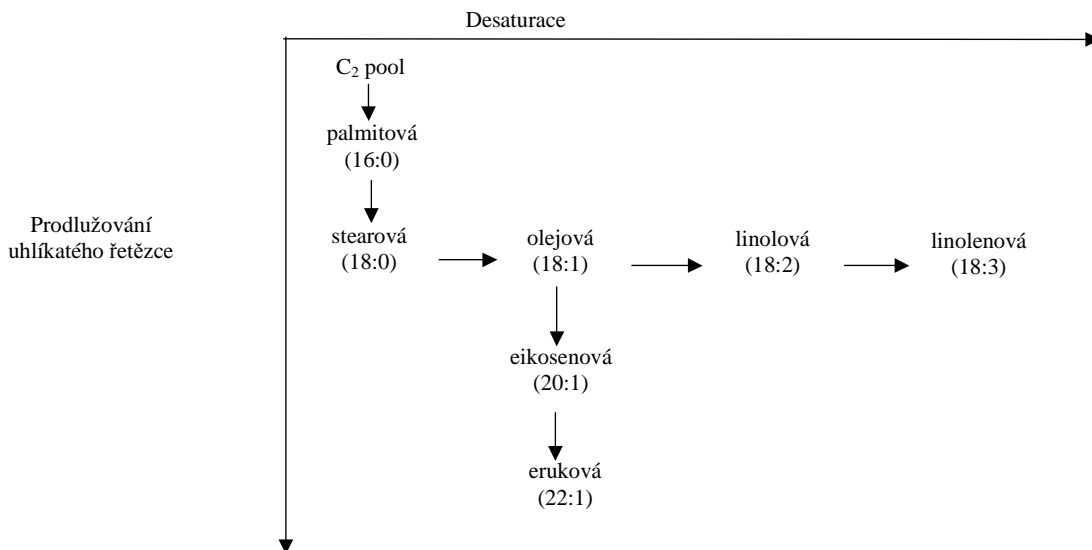
Předpokládané schéma vzniku druhu Brassica napus (U 1935).

Šlechtění řepky

Šlechtění řepky má dlouhou tradici, zpočátku se vycházelo z krajových odrůd. U řepky jsou šlechtěny odrůdy typu syntetických populací, odrůdy typu linie, hybridní odrůdy, transgenní odrůd a hybridní transgenní odrůdy.

Cílem šlechtění je vysoký výnos oleje s olejnatostí více než 45%, obsahu bílkovin více než 25%, kyseliny linolové 25%, kyseliny linolenové maximálně 5%. Kyselina eruková by se neměla vyskytovat vůbec, pokud by produkty byly určené pro lidskou výživu. Obsah glukosinolátů (GSL) by měl být max. 0,6%, nízký by měl být i

obsah vlákniny. Kvalitu oleje lze kontrolovat geneticky (Chloupek 1995). Na následujícím schématu je znázorněna biosyntéza mastných kyselin.



(Cramer 1990)

Každý krok je kontrolován enzymaticky a tudíž i geneticky a lze jej měnit. Takto byly šlechtěny bezerukové odrůdy s vyšším podílem kyseliny olejové pro potravinářství a vysokoerukové odrůdy pro průmysl. Šlechtění na nízký obsah kyseliny erukové je kontrolováno dvěma lokusy se dvěma alelami. Glukosinoláty (GSL) snižují krmnou hodnotu, protože se enzymem myrosinázou rozkládají na thiokyanáty. Šlechtění je zde složitější, je kontrolováno mateřským genotypem, nízký obsah je recesivní, je kontrolován několika lokusy a má nízkou heritabilitu.

Úspěšná odrůda by měla rychle vytvořit listovou růžici po vzejití, mít krátkou ztlustlou lodyhu a hluboce zakořenit, měla by intenzivně kvést a zajistit rovnoměrné dozrávání (Downey a kol. 1987).

U hybridních odrůd se využíval heterózní efekt po sprášení cizím pylem, kdy se heterózního efektu docílovalo buď společným vyséváním dvou různých odrůd s dobrou vzájemnou specifickou kombinační schopností, nebo se vysévalo už vytvořené hybridní osivo.

Šlechtitelské cíle

Šlechtitelské cíle směřují ke šlechtění zejména na:

VÝNOS

Každý z aspektů výnosu je ovládán několika geny. Budeme – li chtít ovlivnit výnos, budeme muset rekombinovat velmi velký počet genů a lze předpokládat, že zlepšení výnosu bude dosaženo četnými znovuospořádáními genů. Lze toho dosáhnout spíše konvenčním šlechtěním než přenosem jednotlivých genů genovým inženýrstvím (Gerats a kol. 1993).

JAKOSTNÍ UKAZATELE

Obsah oleje, změny v zastoupení kyselin linolové a linolenové, nízký obsah glukosinolátů, vlákniny a bílkovin, délku vegetační doby, zimuvzdornost, odolnost k chorobám a škůdcům.

Šlechtění řepky pro krmné účely, šlechtění řepky z hlediska obsahu látek v semeni. Při volbě odrůdy je potřeba brát v úvahu hledisko, jak vysokou kvalitu oleje dostaneme a jak dobře prodáme extrahovaný šrot, jak bude dlouhá vegetační doba, schopnost přezimovat. Je nutné proto nepěstovat jen jednu odrůdu, ale více s různou délkou vegetační doby (Rod 1982).

Typy řepky

- „EG“ (++) Řepky erukové, dříve pěstované, obsah kyseliny erukové (cca 50%) a s vysokým obsahem glukosinolátů. Dnes už jen jako plevel, nebo pro průmyslové využití.
- „O“ Řepka, snížený obsah kyseliny erukové (do 5%), vysoký obsah glukosinolátů. Objevuje se jako plevel na polích.
- „OO“ Snížený obsah kyseliny erukové (do 2%), snížený obsah glukosinolátů (pod 30 mikromolů/gram semene).
- „OOO“ Řepka se sníženým obsahem vlákniny na cca 6%, jinak stejná kvalita jako „OO“ odrůda. Vyznačuje se světlým oseměním.
- „EG“ (+O) Řepka, vysoký obsah kyseliny erukové cca 50%, snížený obsah glukosinolátů pod 30 mikromolů/gram semene. Dnes se využívá pro průmyslové využití.

(Diviš a kol. 2000)

Systemy zabraňující opylování

Je několik systému, které zabraňují samosprášení řepky. Jaderná samčí sterilita (GMS), cytoplazmatická forma samčí sterility (CMS), genově – cytoplazmatická forma pylové sterility a inkompatibility (Ondřej, Drobník 2002).

Jaderná samčí sterilita

Je mechanismus, který umožňuje řízené sprášení, nebo – li genetickou kastraci. Jaderná samčí sterilita je řízená jadernými geny, je recesivní a sporofytického typu. Po zkřížení pylově sterilních dominantních homozygotů s recesivními homozygoty vznikají pylově sterilní heterozygoti. F₁ generace musí být úplně fertillní, proto musí jeden z nich obsahovat gen pro obnovu fertility (Ondřej, Drobník 2002).

Typy jaderné samčí sterility

PYLOVÁ STERILITA

Způsobuje aborci pylu.

TYČINKOVÁ STERILITA

Brání přeměně v pestíky nebo způsobuje nepřítomnost tyčinek.

FUNKČNÍ STERILITA

Způsobuje neschopnost prašníků otevírat se a uvolňovat pyl.

ASYNAPTICKÁ, DESYNAPTICKÁ STERILITA

Způsobuje neschopnost nebo částečnou neschopnost synapse chromozomů v meióze.

Transgenní pylová sterilita

Pylová sterilita podmíněná transgenozí je navozena pomocí genového inženýrství, a to vnesením transgenu. Její mechanismus spočívá ve využití kódující sekvence pro barnázu, která je řízená promotorem specifickým pro buňky prašníků vystlané vrstvou buněk tapeta. Pylové mateřské buňky obklopuje pylový váček tapetum,

který v průběhu vývoje pylových zrn podléhá degradaci. To má za následek degeneraci pylových zrn, to je podstatou pylové sterility. Proteiny produkované buňkami tapeta napomáhají vývoji pylu, nebo se stávají komponenty vnějších stěn pylových zrn. Byl zvolen promotor (TA29) gen pro barnázu, vytváří úplnou pylovou sterilitu rostliny. V příští generaci můžeme sterilitu odstranit, ale druhý z rodičů musí být homozygotní pro transgen, který kóduje protein barstar se stejným promotorem jako barnáza, neboť inhibuje barnázu (Káš a kol. 2004).

Genově – cytoplazmatická sterilita

Genově – cytoplazmatická pylová sterilita je podmíněná účinkem specifických jaderných genů (rfrf) přítomných v „S“(sterilním) typu cytoplazmy. Je nejvyužívanějším typem pylové sterility. Nejdříve se vytvoří tzv. sterilní analog opylováním pylem otcovské linie. Vytvořený hybrid je sterilní, musíme jej stabilizovat zpětným křížením. Můžeme takto získat sterilní analog jakékoli fertillní linie, protože cytoplazmatická pylová sterilita se přenáší cytoplazmou po matce.

- 1.rok ($A_{st} \times B$) bez kastrace, ($C_{Rf} \times D_{Rf}$) s kastrací,
- 2.rok ($(A \times B)_{st} \times (CD)_{Rf}$,
- 3.rok ABCD fertillní.

Index st značí pylovou sterilitu a RF obnovitele pylové fertility (restorer of fertility). Jde o jednoduchý gen obnovující fertilitu u sterilní S cytoplazmy. Je dominantní (Chloupek 1995).

Cytoplazmatická sterilita

Cytoplazmatická pylová sterilita se vyskytuje velmi vzácně. Kontrolují jí faktory přítomné v cytoplazmě, které mají základ v mitochondriální DNA.

U řepky se vyskytuje 7 druhů CMS, nejznámější jsou 4 typy, které mají původ ve vnitrodruhovém, mezidruhovém křížení, nebo ve spontánní mutaci.

- CMS ogu – pochází z japonské ředkve *Raphanus sativus*

Po přenosu jádra druhu *B. oleracea* do cytoplazmy druhu *Raphanus sativus*, byla tato sterilita vnesena do řepky mezirodovým křížením. Problémem praktického využívání SMS jsou vhodné udržovatelé sterility a obnovitelé fertility s Rf geny.

- CMS jun – pochází z odrůd druhu *Brassica juncea*, má vysokou stabilitu s možností obnovy fertility.
- CMS nap – pochází z křížení odrůd ozimé a jarní řepky s polskou odrůdou „Bronovski“. Pylovou sterilitu kontrolují dva jaderné geny (rf_1rf_1 , rf_2rf_2). Tento nestálý systém podléhá vlivům vzduchu a teploty. Poprvé ho popsal Thompson roku 1972. Shiga a Obkava objevili stejný typ.
- CMS pol – byl objeven v populaci jarní řepky „Polima“, je geneticky podmíněný genotypem $rfrf$. Jsou známy i obnovitelé s Rf geny. Je méně stabilní (Ogura 1968).

Autoinkompatibilita (AI) u řepky

Autoinkompatibilita znamená neschopnost pylové gamety oplodnit mateřskou gametu téhož jedince, self – incompatibility. Jde o úplnou inhibici pylové láčky při samoopylení. Aktivní glykoproteiny, které jsou na povrchu blizny zastaví růst pylové láčky u vlastního pylu. Cizí pyl může růst dál (Graman a kol. 1999).

Brassica rapa i *Brassica oleracea*, z těchto druhů vznikla kulturní řepka a tyto druhy jsou přirozeně inkompatibilní. Současné odrůdy řepky mají díky šlechtění a výběru ve svém genomu nefunkční alely pro AI. Výskyt AI rostlin u současných odrůd je okolo 0,1% (Kučera a kol. 1995).

Autoinkompatibilita je jedním ze systémů, jak se rostlina účinně brání oplození vlastním pylem. Chrání se tak před imbreední depresí, která vznikne při samosprášení a při opakujícím se imbreedingu (samosprášení nebo opylení vlastními jedinci). Autoinkompatibilita je kontrolována sérií S – alel, projevující se interakcí v blizně a pylu, to znamená, že pyl může prorůstat jedině tehdy, jsou – li S – alely v čnělce a pylu různé (Sobotka 2001).

Získat AI linie řepky by se mohlo provádět pomocí selekce ze starých odrůd a křížení těchto linií se současnými odrůdami. Jsou zde problémy s vnesením nežádoucích znaků a tím snížení kvality. Předpokládá se vazba genů zodpovědných za

AI s geny pro zvýšený obsah GLS (Kučera a kol. 1995). Pro heterozní šlechtění je nutné vyloučit samosprašení uvnitř linií. Buď samčí sterilitou, nebo autoinkompatibilitou (Cramer 1990).

Gen *SLG*, který se nachází na S - lokusu se ukázal být vhodný také pro markerování autoinkompatibility. Jeho funkce ještě není přesně známá, ale předpokládá se, že má pomocnou úlohu při průběhu AI reakce (Luu a kol. 1999). Podílí se na pylové adhezi, je důležitý ve stabilizaci genu *SRK* a posiluje difúzi pylového faktoru do blizny (Schopfer a kol. 1999). Mohl by také podporovat proces rozpoznání *SCR* nebo tento gen transportovat k cytoplazmatické membráně (Takasaki a kol. 2000). Gen *SLG* má velice podobnou nukleotidovou sekvenci jako gen *SRK* (Takasaki a kol. 2000).

Na S – lokusu jsou ještě další geny, které se podílejí na autoinkompatibilní reakci (Sáková a kol. 2002). Jsou to vysoce polymorfní geny:

- Gen *SLG* (S – lokus glycoprotein) (Nasrallah a kol. 1991).
- Gen *SRK* (S – locus receptor kinase) kóduje transmembránový protein. Je to klíčový gen pro rozpoznávací reakci a AI odpověď. Exprimuje se v blizně.
- Gen *SCR* je exprimován pouze v prašnicích. Vytváří protein, který je považován za samčí determinant AI a produkují ho buňky tapeta. Váže se na protein (PCP – pollen coat protein) *SLG* genu a je lokalizován mezi geny *SLG* a *SRK* (S – locus cystein rich protein) (Cuřínová 2006).

Charakteristika *SLG* genu

SLG byl intenzivně studovaným proteinem v autoinkompatibilní reakci, kde se mu také přikládala velká úloha. V polovině devadesátých let toto bylo zpochybňováno, když se objevily AI linie, které produkovaly normální množství *SLG* (Gaude a kol. 1995). Poslední výsledky ještě stále nedokázaly objasnit úplně přesnou funkci *SLG* (Sobotka 2001).

SLG (S - locus glykoprotein) se sestává ze dvou různých genů *SLGA* a *SLGB* (Cabrillac 1999). Tento gen je dlouhý asi 1,3 kb a kóduje glykoprotein, který je sekretován do buněčné stěny buněk na povrchu blizny (Kusaba a kol. 1997). *SLG* geny jsou si sekvenčně podobné, a proto byly rozděleny do dvou tříd. Tyto dvě třídy jsou si podobné jen ze 65% v sekvenci AMK (Chen 1990). V rámci haplotypu je gen *SLG* více

sekvenčně příbuznější S – doméně genu *SRK* než jakákoliv jiná alela genu *SLG* (Stein a kol. 1991). Tento genový pár se podílí na rozpoznání samčího determinantu a s tímto souvisí právě ta sekvenční podobnost. Zjistilo se, že aminokyselinové sekvence S–domény *SRK* jsou vysoce konzervativní v rámci těchto linií a sekvence *SLG* se od sebe liší mohem více (Kubasa a kol. 2000). Dosud všechny identifikované *SLG* geny II. třídy pocházejí z recesivních haplotypů a všechny *SLG* geny třídy I jsou dominantní (Okazaki a kol. 1999).

Molekulární markery ve šlechtění řepky

Genetický marker nebo – li signální gen je označení pro znak, který má jasný fenotypový projev a je jednoduše dědičně založen. Musí být zabezpečeno spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvalitativními nebo kvantitativními znaky (Čurn, Sáková, 1996). Molekulární markery představují markery na úrovni DNA. Jsou založeny na polymorfismu DNA. Umožňují jednoduše určovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese (Graman a kol. 1999). Nejvíce používané markery jsou:

RFLP, PCR, PCR – RFLP, RAPD, AFLP, SPLAT, MAP a mikrosatelitové markery.

Základem molekulárních markerů je odlišení aktivních a neaktivních alel a rozlišení jednotlivých haplotypů u AI rostlin. K tomu je zapotřebí pouze malá část rostlinné tkáně. Nemusíme čekat na fenotypový projev autoinkompatibility resp. autokompatibility. Molekulární markery lze užít pro:

- vyhledávání AI rostlin z populace
- pro selekci po křížení
- pro vytvoření vhodných linií, které vzájemně sprášíme, nedoje k vzájemnému opylení rostlin v rámci jedné linie.

Metody založené na amplifikaci nukleových kyselin

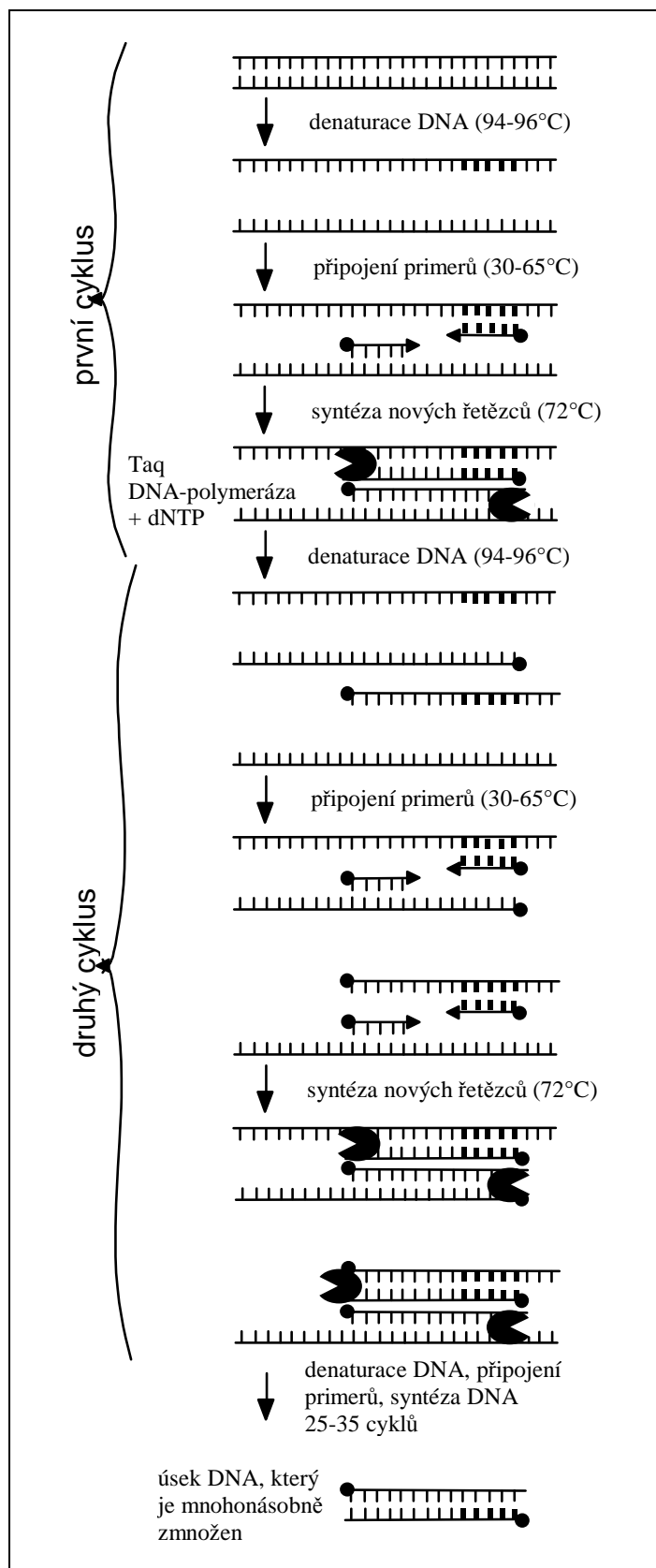
POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

(Polymerase Chain Reaction)

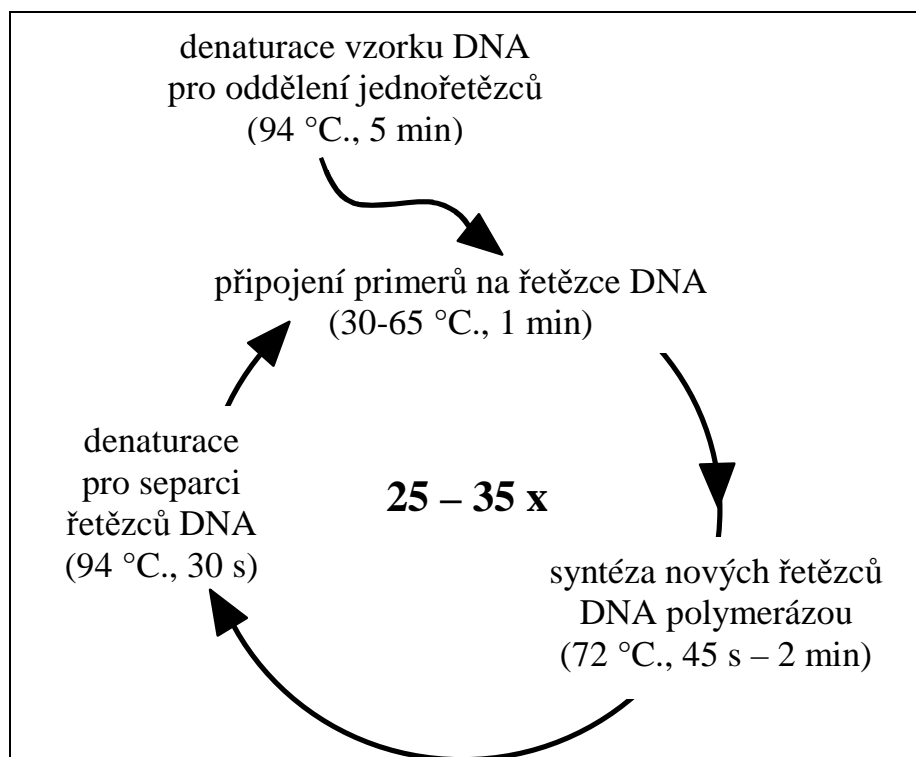
Polymerázovou řetězovou reakci (PCR) zavedl v roce 1985 Kary B. Mullis. Pomocí PCR se umožňuje získat požadovanou, specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech. PCR je založena na replikaci nukleových kyselin. Při PCR se cyklicky opakuje enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tím, že jejich 3' - konce směřují k sobě. Když se přidá DNA – polymeráza a nukleotidy, probíhá syntéza nových vláken po obou matricových řetězcích protisměrně. Na syntézu DNA se používají termostabilní polymerázy, které se izolovaly z termofilních mikroorganismů, př. Taq DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotám, kdy už DNA podléhá denaturaci. Syntéza DNA pak probíhá formou opakovaných cyklů. V závislosti na teplotě reakční směsi se střídají pravidelně tři kroky, během kterých se střídají tři odlišné děje, které mají různé nároky na teplotu (Šmarda a kol. 2005).

- Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C).
- Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30 – 65 °C).
- Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA – polymerázy (65 – 75 °C).

Počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a pohybuje se v rozmezí 25 – 30 cyklů. Pokud by byl vysoký počet cyklů, mohou vzniknout nespecifické produkty PCR. PCR je velice citlivá a specifická a může dojít ke kontaminaci neznámou DNA, tím získáme falešný signál (Cuřínová 2006).



Obr. 1 Princip standardní polymerázové řetězové reakce (PCR)
(Šmarda a kol. 2005)



Obr.2 Teplotní režim a doba trvání jednotlivých kroků při (PCR)
(Šmarda a kol. 2005)

POLYMORFISMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (PCR – RFLP)

(RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism)

PCR – RFLP je modifikace standardní PCR. PCR - RFLP se používá pro typizaci cílové sekvence určitého genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus. Zaklonování a osekvenování *SLG* genu znamenalo počátek detekce polymorfismu S – lokusu přímo na úrovni přímo DNA, před rozvojem PCR metodou PCR – RFLP. Jednotlivé alely genu *SLG* se příliš neliší v počtu bazí, je ale velmi vysoký polymorfismus v sekvenci nukleotidů. Některé úseky jsou ale naopak konzervativní, proto je důležité navrhnout univerzální PCR primery. Byly navrženy dva typy primerů. První typ využil konzervativní úseky napříč celou S - genovou rodinou (Brace a kol. 1993). V tomto případě se naamplifikují také homologní sekvence *SRK*, *SLR1*, *SLR2*. Zde není jisté, že detekovaný polymorfismus indikuje odlišnou alelu S – lokusu. Druhý typ primerů byl specificky amplifikující pouze gen *SLG*, zde se ale neamplifikují žádné

recesivní alely tohoto genu. Proto byly navrženy také primery pro gen *SLG II*, ty ale nejsou tak specifické jako pro *SLG I* (Nishio a kol. 1996). Pomocí kombinace těchto primerů je možné naamplifikovat *SLG* geny ve většině S – haplotypů. Výsledky získané touto metodou jsou důvěryhodné, a tak se používá dodnes (Nasrallah 1985). Pomocí PCR se naamplifikuje (namnoží) specifický fragment DNA, úsek genu, který se dále štěpí restriční endonukleázou. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce, které se následně detekují elektroforeticky a vzniklé fragmenty jsou separovány na agarózovém gelu. Do agarózového gelu se přidává látka ethidium bromid, který umožní přečíst výsledek pod UV světlem. Touto metodou můžeme charakterizovat odlišné S – alely u *B. napus*, nebo ji můžeme využít k restričnímu štěpení genu *SLG*, který si naamplifikujeme pomocí klasické PCR (Sobotka 2001).

Pro rutinní využití je metoda PCR – RFLP velmi vhodná a umožnila nahradit metodu RFLP, která je časově náročná a pracná, vyžaduje dostatek kvalitní DNA a vhodnou sondu pro hybridizaci. V případě detekce *SLG* se navíc používá pouze radioaktivní značení, což obnáší mít specializované pracoviště (Nishio 1997).

DÉLKOVÝ POLYMOFISMUS AMPLIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ (AFLP)

(Amplified Fragment Length Polymorphism)

Tato metoda kombinuje restriční štěpení DNA (technika RFLP) a amplifikaci DNA (technika PCR) (Graman a kol. 1999). Tato metoda poskytuje vysoké rozlišení a dobrou reprodukovatelnost. Označuje se také jako amplifikace vzácných restričních míst (IRS-PCR) nebo selektivní amplifikace restričních fragmentů DNA podmíněná primerem (SRFA).

Tato metoda se skládá ze čtyřech základních kroků:

1. Dokonalé rozštěpení velmi malého množství genomové DNA jednou nebo dvěma restričními endonukleázami. Jedna z nich mívá většinou méně cílových míst.
2. Ligace genomové DNA s oligonukleotidovými adaptory, které jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restričního místa. Ligace probíhá za přítomnosti restriktáz, proto nedochází ke spojení restričních fragmentů.

3. Selektivní amplifikace sady restričních fragmentů za pomoci jednoho nebo dvou selektivních AFLP – primerů.
4. Elektroforézy amplifikovaných fragmentů v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu.

Použitím AFLP můžeme vizualizovat sadu restričních fragmentů pomocí PCR bez znalosti jejich nukleotidové sekvence. Použitím sekvencí adaptoru a zbytku restričního místa, naamplifikujeme restriční fragmenty. Abychom naamplifikovali pouze části adaptovaných fragmentů, navrhly se AFLP primery tak, že jsou delší o jednu až tři náhodně zvolené báze na 3'-konci. To se děje směrem k neznámé sekvenci fragmentu, který bezprostředně sousedí s restričním místem. K amplifikaci a prodloužení primeru dochází, když se komplementárně páruje 3'-konec AFLP – primeru. Dojde k selektivnímu výběru malé části z velkého počtu fragmentů, které se vytvořily štěpením genomové DNA. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restričních míst, je analogický s polymorfismem RFLP (Šmarda a kol. 2005).

POLYMORFISMUS NÁHODNĚ AMPLIFIKOVANÉ DNA (RAPD)

(Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Je to rychlá a jednoduchá technika pro fingerprinting DNA, je vhodná pro rychlou typizaci genomové DNA (Cuřínová 2006). Tato metoda se řadí mezi PCR techniky. Krátký primer o délce 6 – 10 nukleotidů se používá k zahájení PCR a váže se na daná místa templátové DNA. RAPD je někdy také označovaná jako AP – PCR = Arbitrality Primed PCR). Někdy se první dva cykly provádí s jedním krátkým náhodným primerem, a to za mírných reakčních podmínek a další cykly se provádí se specifickými primery. Takto vznikne řada PCR fragmentů, ty se separují elektroforézou na agarózovém gelu a vizualizovány pomocí UV záření. Aby se získaly reprodukovatelné výsledky, je nutné zabezpečit tyto faktory: přesnou optimalizaci koncentrace DNA, podmínky PCR reakce (teplotu annealingu), koncentrace primerů, koncentrace iontů Mg^{2+} přesnost pipetování a i výběr polymerázy. Jedinci se odlišují přítomností jednotlivých fragmentů tím, že DNA primer najde homologní místa na určitém místě. Toto je důsledek polymorfismu DNA. RAPD technika má dominantní charakter, a proto nelze odlišit heterozygotní a homozygotní genotyp (Williams a kol.

1993). Genomy příbuzných, ale i vzdálenějších druhů jsou velmi shodně organizovány, proto je důležité vyhledat právě primer, který vykazuje odlišnou polohu proužků u velmi příbuzných organismů - (polymorfismus) (Čurn, Sáková 1996).

TANDEMOVÁ OPAKOVÁNÍ KRÁTKÝCH MOTIVŮ (SSR – MIKROSATELITY)

(Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats)

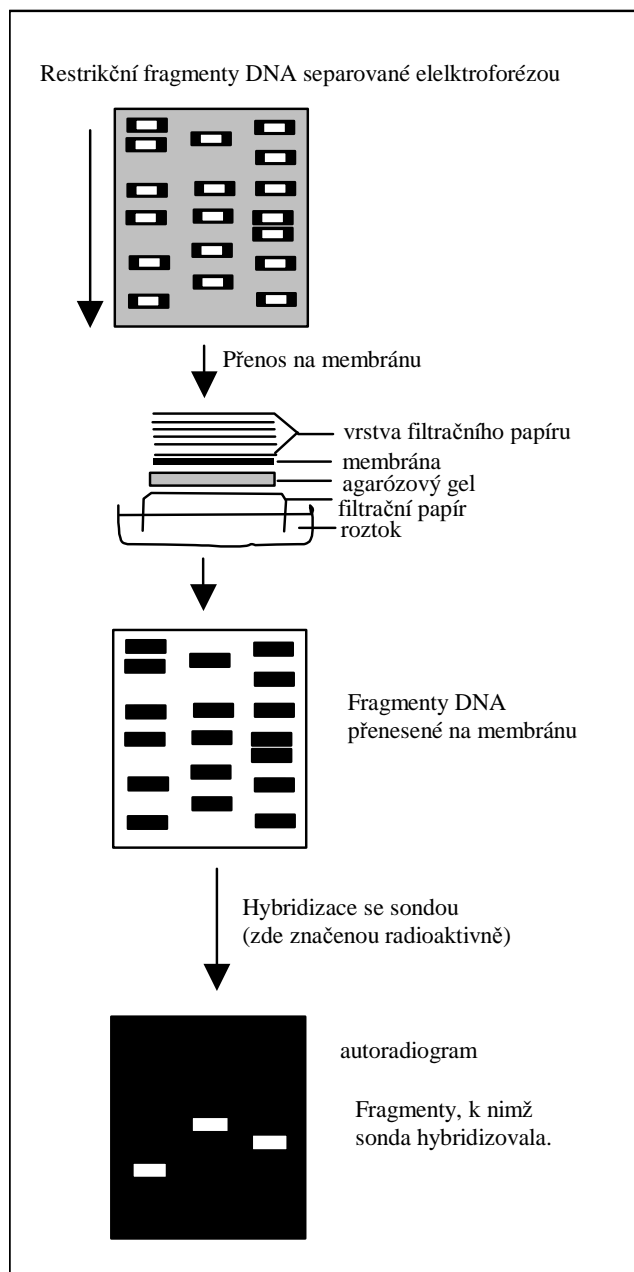
Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice složené z mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidových motivů. Vyznačují se vysokým stupněm polymorfismu, může být rychle a spolehlivě testován pomocí PCR a vizualizován pomocí elektroforézy na akrylamidovém gelu. Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a také k určování vztahů mezi nimi v genetice populací (Šmarda a kol. 2005).

SOUTHERNŮV PŘENOS

(Southern blot, hybridization, blotting, transfer)

Přenos DNA neboli Southernův přenos podle E. M. Southerna, který zavedl kapilární přenos, při němž jsou nukleové kyseliny unášeny pufrům postupujícím gelem a hybridizační membránou. Pohyb pufru je zajištěn kapilárními silami, které vyvolává savý materiál navrstvený na membránu (Hemleben 1990).

Vlastní hybridizace se provádí s radioaktivně nebo neradioaktivně značenou sondou v roztoku, pak následuje vizualizace. Při použití neradioaktivně (chemiluminiscenčně) značené sondy, je možná přímá vizualizace. Metoda určuje přítomnost úseků DNA homologních se sondou a přibližně i o jejich počtu (Ondřej, Drobník 2002).



Obr.4 Hybridizace restrikčních fragmentů DNA přenesených na membránu (Southernův přenos) (Rosypal 1997)

Metody PCR s cílem na určité sekvence a jednoduché lokusy

CAPS

(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Jedná se o spojení metod PCR a RFLP. Tato reakce se skládá z několika kroků. Prvním krokem je amplifikace PCR markeru, ten se poté rozštěpí restrikční

endonukleázou, která je specifická. Místo, kde došlo ke změně polynukleotidového řetězce, je shodné s cílovým místem dané endonukleázy. Tím dojde k odhalení polymorfismu restričních míst. Následně dojde k detekci bodových mutací. Odliší se fragmenty markeru na dominantní a recesivní alelu toho genu. Provede se elektroforéza na agarózovém gelu, vizualizuje se pomocí UV záření s přidáním ethidia bromidu do gelu. Tato metoda se používá ke genetickému mapování.

SEKVENOVÁNÍ

Tato metoda přesně určuje nukleotidové sekvence určitého izolovaného fragmentu DNA. Je to nejpřesnější, nejnáročnější, nejsložitější a nejdražší určení přesného pořadí bází v určitém úseku DNA. Nejznámější a nejpoužívanější jsou Maxam – Gilbertova metoda a Sangerova metoda (Alberts a kol. 2005).

- Maxam – Gilbertova metoda

Tato chemická metoda dostala jméno po svých objevitelích. Zakládá se na specifickém rozštěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech, kde je lokalizována báze určitého typu. Na začátku musíme mít soubor identických fragmentů jednořetězcové DNA označených na jednom konci radioaktivní značkou. Každý typ báze v molekule DNA můžeme modifikovat tak, aby bylo možné v tomto místě dosáhnout přerušení řetězce DNA. Samotný postup sekvenování probíhá v následujících krocích:

1. Připravit značené jednořetězcové fragmenty DNA, jejichž sekvenci potřebujeme stanovit.
2. Rozdělit si fragmenty do čtyř vzorků.
3. Působit chemickou látkou, která specificky modifikuje jeden nebo dva typy bází DNA u každého vzorku.
4. Působit další chemickou látkou, která rozštěpí řetězce DNA ve všech místech, kde byly báze modifikovány.
5. Rozdělit fragmenty DNA elektroforézou na polyakrylamidovém gelu.
6. Autoradiografická detekce fragmentů, objeví se jen ty, které nesou značený konec.
7. Stanovení sekvence DNA odečtem poloh pruhů v jednotlivých drahách.

Maxam – Gibertova metoda není až tak běžně používaná, protože reaktivita chemických činidel může být ovlivněna různými nečistotami, musíme používat radioaktivní značení konců, což znamená vysokou úroveň radioaktivity a v porovnání s enzymovým sekvenováním poskytuje chemicky kratší sekvence a laboratorně je to náročnější.

- Sangerova metoda

Je to enzymová metoda sekvenování. Je nazývána též „dideoxy sekvenování“, používají se totiž 2,3 – dideoxynukleotid trifosfáty (ddNTPs), ty nemají na svém konci 3' hydroxylovou skupinu. Jednovláknová (ss) DNA je osekvenována a je jako templát pro in vitro DNA syntézu. Synteticky značený 5' konec oligodeoxynukleotidu se používá jako primer. Stejně jako u chemické metody jsou reakce prováděny ve čtyřech vzorcích. Tato metoda se používá více než předchozí (Šmarda a kol. 2005).

KLONOVÁNÍ DNA

Klonování DNA znamená tvorba DNA – klonů. Klonování umožňuje izolovat z komplexního genomu jeho dílčí úseky, ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně zmnožit. DNA – klon nebo také molekulární klon je označení pro segment DNA přenesený prostřednictvím klonovacího vektoru do hostitelské buňky. V této buňce se replikuje s vektorem, v tomto případě DNA, která má schopnost přijmout cizorodou DNA a je schopna autonomní replikace v hostitelské buňce. Cizorodá DNA je jakýkoliv segment DNA vložený kovalentně ligací do klonovacího vektoru. Je také označovaná jako rekombinantní DNA.

Oblasti využití klonování:

- izolace genů, studium jejich struktury a funkce
- studium regulačních oblastí, které řídí expresi genů
- fyzikální a genetická analýza genomů
- exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích

Základní kroky klonování:

- Příprava rekombinantní molekuly DNA.
- Přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky.

- Selektce klonů obsahujících rekombinantní DNA.

Ke klonování lze použít molekuly DNA různého původu:

- genomová DNA izolovaná z donorového organismu
- komplementární DNA připravenou zpětnou transkripcí z mRNA
- DNA připravená uměle chemickou analýzou (*Hemleben, V., 1990*).

KLONOVACÍ VEKTORY

Používají se kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace odvozené z plazmidů nebo virů. Nejvíce jsou používány vektory plazmidů *Escherichia coli* a bakteriofág λ . Klonovací vektory se skládají z replikátoru, struktury selekčního systému a restrikčního místa, které umožňuje snadnou inserci klonovaného fragmentu (Lodish a kol. 2005).

Plazmidové vektory

Plazmidy jsou dvouvláknové DNA (dsDNA), kruhové molekuly, ty jsou odděleny od buněčné chromozomální DNA. Vyskytují se v jádře kvasinek a v bakteriích (Lodish a kol. 2005).

Vlastnosti klonovacího vektoru odvozeného z plazmidu:

- Malá velikost (2 – 15 kb), Malé plazmidy se snadno izolují a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií.
- Schopnost snadného a účinného přenosu do hostitelských buněk.
- Použití genů, které buňkám propůjčují rezistenci k antibiotikům, ampicilinu, tetracyklinu, chloramfenikolu a neomycinu.
- Musí nést jedinečná restrikční místa pro restrikční endonukleázy, do nichž se začleňuje cizorodá DNA. Novější vektory obsahují seskupení většího počtu restrikčních míst (Rosypal 1997).

Vektory pro speciální účely

Expresní vektory

Obsahují silný promotor umístěný proti směru transkripce od klonovacího místa.

Kyvadlové vektory

Mají dva počátky replikace, které jim umožňují se replikovat v buňkách dvou různých organismů, např. *E. coli* a *B. subtilis* nebo v kvasinkách. Výhodou je snadné klonování genu do *E. coli*. Z *E. coli* lze rekombinantní plazmid izolovat ve velkém množství a přenést do druhého hostitele. Rekombinantní molekuly připravené *in vitro* se přenášejí s velmi nízkou účinností (Hemleben 1990).

Vektory odvozené z bakteriofága lambda

Při konstrukci vektorů z tohoto fága se vychází z toho, že střední třetina genomu není pro jeho lytický růst nezbytná a lze ji nahradit cizorodou DNA (Rosypal 1997). Tělo bakteriofága λ se skládá z hlavy a bičku, který infikuje hostitelskou buňku *E. coli*. (Lodish a kol. 2005).

Výhody ve srovnání s plazmidovými vektory:

- Rekombinantní DNA se může sbalit *in vitro* do fágových kapsidů a zavést do hostitelských buněk normální fágovou infekcí.
- Klonovací kapacita fága dosahuje 23 kb a je více než 2x vyšší oproti plazmidovým vektorům.
- V jedné zkumavce lze uchovávat celou genovou knihovnu ve formě fágových virionů (Rosypal 1997).
-

Kosmidy

Kosmidy jsou vektory, které jsou odvozené z plazmidů, do nichž byla naklonována místa *cos* z bakteriofága lambda. Přítomnost místa *cos* na plazmidu umožňuje, aby připravená rekombinantní DNA začleněním cizorodé DNA do klonovacího místa na kosmidu, byla sbalena *in vitro* sbalovacím extraktem fága lambda a transdukcí přenesena do hostitelských buněk. Uvnitř bakterií nabývá kosmid kružnicové formy, neobsahuje všechny podstatné geny fága lambda, nemůže procházet lytickým cyklem, proto se v buňkách replikuje jako plazmid. Selektování klonů

umožňují na kosmidu plazmidové geny, které určují rezistenci k antibiotikům (Cuřínová 2006).

Plazmidové vektory nesoucí bakteriofágové promotory

Cizorodá DNA začleněná do vektoru může být přepisována *in vitro*, když se linearizovaná DNA inkubuje s příslušnou RNA polymerázou a ribonukleotidy. U některých vektorů jsou na opačných koncích klonovacího místa umístěny odlišné promotory, to umožňuje přepisovat oba řetězce inzertu DNA. Děje se tak podle toho, která z RNA polymeráz je použita. Tyto vytvořené RNA mohou být použity jako hybridizační sondy (Rosypal 1997).

Umělé kvasinkové chromozomy (YACs)

Tyto chromozomy patří mezi kyvadlové plazmidové klonovací vektory, replikují se v buňkách *E. coli* a v kvasinkách. Části kvasinkového chromozomu obsahují centromeru, sekvence pro replikaci, dvě kvasinkové telomery, selektovatelné signální znaky. Po rozštěpení plazmidu se vytvoří dvě ramena, mezi ty se vloží klonovaná genomová DNA. Rekombinantní DNA se vnese transformací do kvasinkových sféroplastů, tam se chová jako ostatní kvasinkové chromozomy. Je zde obrovská klonovací kapacita, obsahuje několik stovek kb (Lodish a kol. 2005).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Pro tuto práci byly použity autoinkompatibilní linie START, WRG, Tandem. Tyto AI linie byly rozlišovány na základě různých alel genu *SLG II*. Cílem je, aby se různé AI linie mezi sebou sprášily, a tím vznikly hybridy.

Odrůdy: Odila, Global, Topas, Orkan, Jesper, Regent, Ceres, Falkon, Sonata, Arabela, Slapská Stela, Rasmus byly rozlišovány na základě různých alel genu *SLG I*. Bylo zjišťováno, jak je gen *SLG I* polymorfní v generaci odrůd, jak jsou si odrůdy podobné. V rámci jedné odrůdy mají rostliny různé S – alely.

Metody

Izolace DNA

Izolace je provedena komerčním kitem Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek) a byla vyizolována genomová DNA, na izolaci bylo použito 100 mg rostlinného materiálu. DNA je uchovávána v -20°C .

PCR reakce

Pro amplifikaci potřebujeme 1 μ DNA (25 ng) pufr (10 M Tris – HCL; pH 8,3; 50 mM KCL; 2 mM MgCl_2 ; 1% Triton X – 100), nukleotidy dNTP 2 μ l (2,5 mmol každého nukleotidu), primery pro genomovou DNA (Shiba a kol. 2002) 25 pmol každého a 1U Taq polymerázy (0,2 μ l), PCR probíhá ve 45 cyklech. Jeden cyklus probíhá v těchto podmínkách denaturace DNA 30 sek. při 94°C , nasedání primerů (*annealing*) 30 sek. při 55°C a následná polymerace 1 min. při 72°C .

Štěpení PCR produktů

DNA, která vznikne, je štěpena specifickými restrikčními endonukleázami (*Mnl I*, *Hinf I*, *Nsp I*, *ScrF I*). Vzniklé fragmenty DNA jsou následně rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu nebo na 1,5% agarózovém gelu.

PCR – RFLP genu *SLG II*

Stejná reakční směs je provedena s primery PS₂₁ a PS₃ (Nishio a kol. 1996). Probíhá ve 45 cyklech, denaturace DNA 1 min. při 93°C, annealing 2 min. při 58°C, polymerace 3 min. při 72°C. Použity byly enzymy: (*EcoR I*, *Afa I*).

PCR – RFLP genu *SLG I*

PCR – RFLP genu *SLG I* byla provedena stejně jako u genu *SLG II*, byly zde ale použity specifické primery pro gen *SLG I*: P₅ a PS₁₅ a odlišný enzym: (*Mbo I*).

Sekvenování

Sekvenační reakce umožňuje přesně určit nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA. Použili jsme plazmidovou DNA, H₂O, specifické primery a Master mix.

Klonování

Klonování jsme použili pro izolaci genu *SLG I* a *SLG II*. Klonování zahrnuje přípravu rekombinantní molekuly DNA, přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky a selekci klonů obsahujících rekombinantní DNA.

Výsledky

Rozlišení jednotlivých alel genu *SLGII* metodou PCR - RFLP

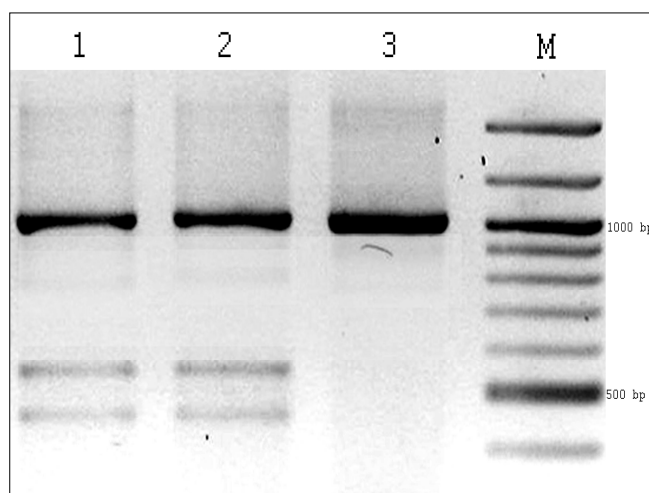
PCR-RFLP genu *SLG II* bylo hlavně zaměřeno na rozlišení *S* - alel AI linií, zatímco pomocí PCR - RFLP byly hledány odlišné alely genu *SLG I* u spektra odrůd a také u různých rostlin v rámci jedné odrůdy.

Metoda PCR-RFLP velmi dobře rozlišovala jednotlivé alely genu *SLG II*, a to jak u jednotlivých zaklonovaných alel, tak u dihaploidních jedinců i kříženců dvou linií. PCR-RFLP spektra, resp. délka fragmentů se vždy shodovala s velikostmi fragmentů odvozených se sekvencí. PCR-RFLP lze používat rutinně pro odlišení *S* - haplotypů, je však zapotřebí minimálně tři restriktivních enzymů.

Analýza spektra odrůd prokázala, že všechny odrůdy nesly alelu A^{10} dominantního genu *SLG* třídy *I* kromě odrůd Topas a Global, kde byla prokázána přítomnost ještě jiné alely *SLG I*. Odlišná alela se však vyskytovala pouze u některých rostlin odrůdy.

AI linie Start – PCR-RFLP genu *SLG II* (*EcoR I*)

Metodou PCR – RFLP jsme naamplifikovali DNA genu *SLG II* u dvou vzorků linie Start. Na gelu zůstala část produktu nerozštěpena a druhá část produktu se rozštěpila na dva fragmenty.



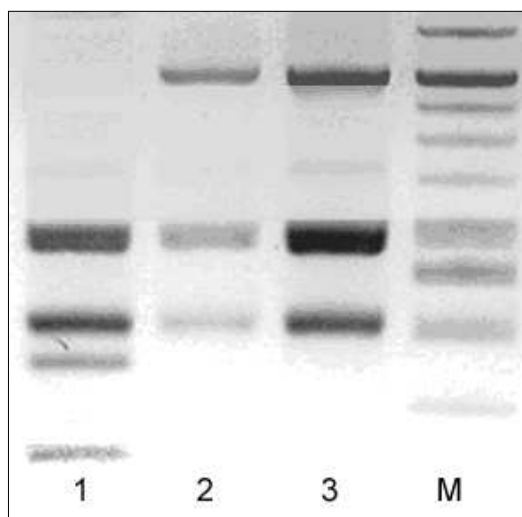
Obr. 1 Ukázka rozlišení produktů amplifikace *SLG* třídy *II* u linie Start.

Vzorky 1 a 2 byly štěpeny restriktázou *Eco RI*. Na gelu zůstává část produktu nerozštěpena – pruh o velikosti něco přes 1000 bp., druhá část produktu je

rozštěpena na dva fragmenty o velikosti necelých 500 a necelých 600 pb. Vzorek 3 je kontrola, kde neproběhlo štěpení restriktázou *Eco* RI. Dráha 1,2,3-AI linie odrůdy Start, M-100 bp ladder.

AI linie Start a WRG – PCR-RFLP genu *SLG II* (*Afa* I)

Vzorek WRG má v genomu alelu S^{15} , ta se štěpí restriktázou *Afa* I na dva fragmenty a druhá aktivní alela se štěpí na tři fragmenty. U linie Start vidíme opět fragmenty ve stejné velikosti jako WRG, díky alele S^{15} . Druhá alela se štěpí na jeden velký fragment a jeden malý, ten není na gelu vidět.



Obr. 2 PCR-RFLP genu *SLG II* AI linie Start a WRG za použití restriktázy *Afa* I.

Vzorek 1 – WRG.

WRG má ve svém genomu alelu S^{15} , která se štěpí restriktázou *Afa* I na dva fragmenty, to jsou první dva pruhy shora. Druhá alela (aktivní) se štěpí na tři fragmenty, to jsou tři pruhy zdola. Na gelu vidíme pouze 4 pruhy, protože kratší fragment z S^{15} a nejdelší fragment z aktivní alely jsou stejně dlouhé-na

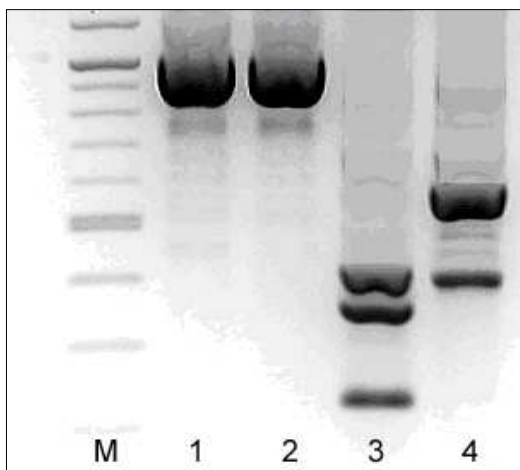
gelu tvoří společný pruh (třetí zdola).

Vzorek 2 a 3 – Start

Start má ve svém genomu opět alelu S^{15} - fragmenty stejné velikosti jako u WRG. Druhá alela se štěpí na jeden velký fragment (nahore) a druhý velmi malý (10pb), který není na gelu viditelný.

AI linie Start a WRG – PCR-RFLP klonů genu *SLG II* (*Afa* I)

Na tomto obrázku jsou 4 vzorky. První dva jsou klony Start a klon Tandem, kde jsou ukázána dvě štěpná místa, která se shodují, a to potvrdilo správnost PCR – RFLP. U vzorku 3, který je klonem z WRG se opět shodují velikosti fragmentů a vzorek 4 je alela S^{15} z linie WRG, opět se shodují velikosti fragmentů.



Obr. 3 PCR-RFLP genu *SLG II* AI linie

Start a WRG za použití restriktázy *Afa I*

Vzorek 1 je klon „Start 1“,

Vzorek 2 je klon Tandem - podle sekvenčních dat se potvrzuje správnost PCR - RFLP - 2 štěpná místa, jeden dlouhý fragment 1015 pb a jeden velmi malý 10 pb, který ovšem není vidět na gelu.

Vzorek 3 je klon z WRG, který byl již

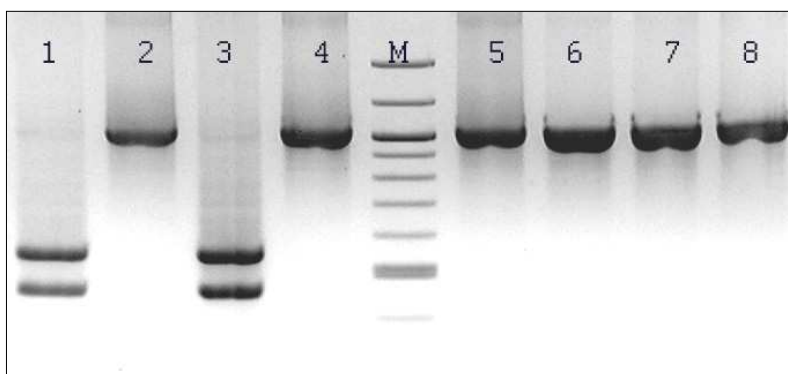
sekvenován (Sobotka, 2001) dle sekvenčních dat se opět shodují velikosti fragmentů.

Vzorek 4 je alela S^{15} z linie WRG, kde se opět shodují sekvenční data s PCR-RFLP.

Podobné výsledky ukázala i spektra PCR-RFLP pro enzymy *Mbo I* a *Msp I*, zde však bylo větší množství fragmentů, proto byla spektra méně přehledná. Velikosti fragmentů se také shodovaly s velikostmi odvozenými se sekvencí.

AI linie WRG, Start a Tandem – PCR-RFLP klonů genu *SLG II* (*Eco RI*)

U této reakce jsme použili restriktázu *Eco RI*. Štěpením jsme odlišili klony WRG s alelou S^{15} . U vzorku 3 se podařilo právě tuto alelu zaklonovat, protože měla jedno štěpné místo pro restriktázu *Eco RI*. U ostatních vzorků byla zaklonována jiná alela než S^{15} .



Obr. 4 PCR-RFLP genu *SLG II* AI linie WRG, Start a Tandem za použití restriktázy *Eco RI*

Štěpení bylo provedeno pro odlišení klonů WRG

s alelou S^{15} , protože u WRG nebyla S^{15} alela odstraněna při klonování. Na gelu je patrné, že u vzorku 1 a 3 se podařilo zaklonovat právě alelu S^{15} , která má jedno štěpné místo pro restriktázu *Eco* RI. U ostatních vzorků se podařilo zaklonovat alelu jinou.

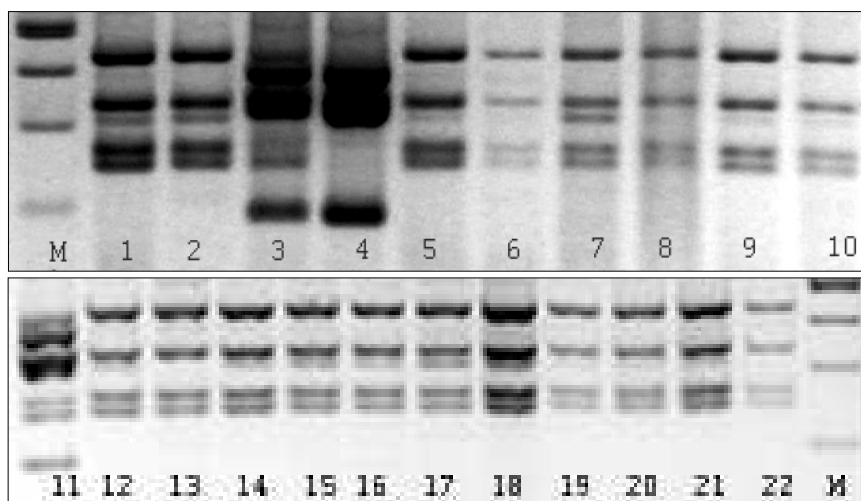
Vzorky 1-5 WRG

Vzorky 6 a 7 Start

Vzorek 8 Tandem

Spektrum odrůd – PCR-RFLP klonů genu *SLG I* (*Mbo* I)

Byla provedena reakce PCR – RFLP genu *SLG I* s restriktázou *Mbo* I. Všechny odrůdy kromě Topas a Regent obsahují alelu A10. Odrůdy Topas a Regent obsahují i jinou alelu.



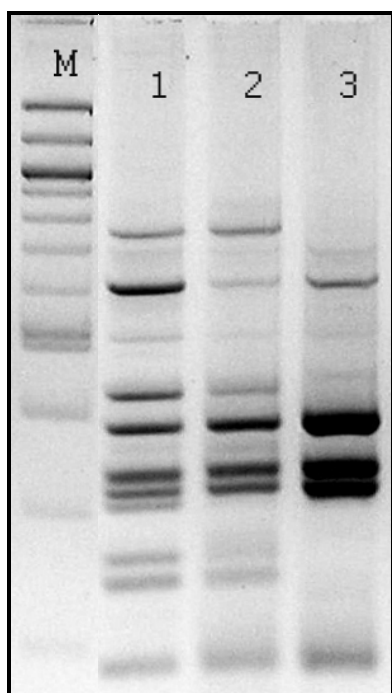
Obr. 5 PCR-RFLP genu *SLG I* spektra odrůd za použití restriktázy *Mbo* I.

Většina odrůd obsahuje alelu A^{10} , pouze odrůdy Topas a Regent podle restriktčních fragmentů obsahují ještě navíc jinou alelu.

Vzorky: 1-Orkan, 2-Jesper, 3-Global, 4-Topas, 5-Regent, 6-Ceres, 7-Falkon, 8-Sonata, 9 Arabela, 10-Slapská Stela, 11-Odila, 12-Rasmus, 13-Zorro, 14-Navajo, 15-Lirajet, 16 Mohican, 17-Laser, 18-Capitol, 19-Pilot, 20-Ramiro, 21-Cando, 22-Catonic.

Odida, Global a Topas – PCR-RFLP klonů genu *SLG I* (*Mbo I*)

Zde jsme provedli reakci za použití restriktázy *Mbo I*, byly to odrůdy, které vykazovaly jiné spektrum pruhů než by bylo pro alelu A^{10} , protože se jednalo o směsné vzorky.



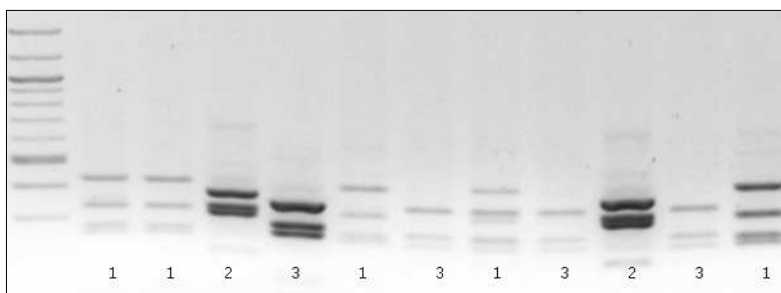
Obr. 6 PCR-RFLP genu *SLG I* u odrůd, které vykazovaly jiné spektrum pruhů než je spektrum pro alelu A^{10} .

Velikost genu *SLG I* je kolem 1300 pb (A^{10} -1330 pb). Sečteme-li velikosti fragmentů u odrůd s odlišnou alelou, dostaneme číslo minimálně dvakrát větší než je 1300 (zejména u odrůdy Odida a Global). Z toho lze usuzovat, že v odrůdách je přítomno více alel. Jednalo se o směsné vzorky, proto bylo dále přistoupeno k analyzování jednotlivých rostlin.

- 1-Odida
- 2-Global
- 3-Topas

Global – PCR-RFLP klonů genu *SLG I* (*Mbo I*)

Byla provedena analýza genu *SLG I* za použití restriktázy *Mbo I*. Zde jsou vidět rostliny se spektrem pruhů, které odpovídá alele A^{10} . To je značené jako vzorky 1. Vzorky 2 jsou rostliny se stejným spektrem jako u odrůdy Topas. Vzorky označené 3 jsou rostliny s úplně jiným spektrem pruhů.



Obr. 13 PCR-RFLP (*Mbo I*) genu *SLG I* u rostlin odrůdy Global.

- 1-Rostliny se spektrem pruhů odpovídající alele A^{10}
- 2-Rostliny se spektrem pruhů stejným jako u odrůdy Topas
- 3- Rostliny s jiným spektrem pruhů

Klonování a sekvenování SLG genu

Cílem bylo klonovat a osekvenovat gen *SLG* třídy I a II. Soubor sekvencí genu *SLG* byl použit jako podklad pro výběr vhodného restričního enzymu pro rutinní používání metody PCR-RFLP určené ke klasifikaci S-alel.

K PCR reakci byla použita genomická DNA izolovaná kitem Invitek. PCR reakce proběhla se specifickými primery pro *SLG I* – PS₅ + PS₁₅, pro *SLG II* PS₂₁ + PS₃. Amplifikované produkty budou po eluci z agarózového gelu zaklonovány pomocí kitu TOPO TA Cloning. Klony jednotlivých alel byly rozlišeny restričním štěpením a odlišné alely byly posléze sekvenovány.

Optimalizace metody PCR-RFLP pro detekci S-haplotypů u řepky

<u>Start 1</u>	1	10	20	30	40	50	60	
<u>Tandem</u>	1	CTCAAGTCCC	ACTGCTGCGG	GTTCTTGGGA	ACGAACCCCTC	TAATACAGTT	ACAGTAAGGT	60
<u>Start 2</u>	1	CTCAAGTCCC	ACTGCTGCGG	GTTCTTGGGA	ACGAACCCCTC	TAATACAGTT	ACAGTAAGGT	60
								1
<u>Start 1</u>	61	70	80	90	100	110	120	
<u>Tandem</u>	61	GACGTGTTTA	GGTCACAGTA	AGAAATAAGAT	CCACAGAAAT	AAAGAGAATC	GCACACGTCC	120
<u>Start 2</u>	1	GACGTGTTTA	GGTCACAGTA	AGAAATAAGAT	CCACAGAAAT	AAAGAGAATC	GCACACGTCC	120
								1
<u>Start 1</u>	121	130	140	150	160	170	180	
<u>Tandem</u>	121	GTTGGTAAAC	TCCAGAACAT	GCTCCATCCC	CATGATGGCG	GGATCCGCGT	GATCGATTG	180
<u>Start 2</u>	1	GTTGGTAAAC	TCCAGAACAT	GCTCCATCCC	CATGATGGCG	GGATCCGCGT	GATCGATTG	180
								1
<u>Start 1</u>	181	190	200	210	220	230	240	
<u>Tandem</u>	181	AGTGCATAGT	CAGTGACTGT	CAATCTGGAG	TAGATGCTTT	GGTTGGTCAT	ATGGAACGTG	240
<u>Start 2</u>	1	AGTGCATAGT	CAGTGACTGT	CAATCTGGAG	TAGATGCTTT	GGTTGGTCAT	ATGGAACGTG	240
								1
<u>Start 1</u>	241	250	260	270	280	290	300	
<u>Tandem</u>	241	TAAGCGATCT	CCTCACTGTT	CTCCGTATAA	TTGTA AACCA	TGTAATTTAA	TCCTTGCACC	300
<u>Start 2</u>	1	TAAGCGATCT	CCTCACTGTT	CTCCGTATAA	TTGTA AACCA	TGTAATTTAA	TCCTTGCACC	300
								1
<u>Start 1</u>	301	310	320	330	340	350	360	
<u>Tandem</u>	301	TCCGGTATGC	CATTAACTC	GATTCATTC	CAAGGACCCG	TCCTTTGCAT	TACAACACGT	360
<u>Start 2</u>	1	TCCGGTATGC	CATTAACTC	GATTCATTC	CAAGGACCCG	TCCTTTGCAT	TACAACACGT	360
								1
<u>Start 1</u>	361	370	380	390	400	410	420	
<u>Tandem</u>	361	TGATTCAAAA	ATCGATTTAT	AAGAAATAAAC	TCAGGCAATC	CCCTTTGTAT	GTCCAGTTTC	420
<u>Start 2</u>	1	TGATTCAAAA	ATCGATTTAT	AAGAAATAAAC	TCAGGCAATC	CCCTTTGTAT	GTCCAGTTTC	420
								1
<u>Start 1</u>	421	430	440	450	460	470	480	
<u>Tandem</u>	421	TAGGTGAATT	TCCCGCTTGA	CGGATCGTCA	TAGGATCTCC	ATGATGTAAG	GAACTGTTC	480
<u>Start 2</u>	1	TAGGTGAATT	TCCCGCTTGA	CGGATCGTCA	TAGGATCTCC	ATGATGTAAG	GAACTGTTC	480
								1
<u>Start 1</u>	481	490	500	510	520	530	540	
<u>Tandem</u>	481	CGCCCTGTTT	TGAATCGTA	ACCTAGTTTC	ATCTCCGGAA	GTAAGATATC	TGTCGGAAAA	540
<u>Start 2</u>	1	CGCCCTGTTT	TGAATCGTA	ACCTAGTTTC	ATCTCCGGAA	GTAAGATATC	TGTCGGAAAA	540
								60
<u>Start 1</u>	541	550	560	570	580	590	600	
<u>Tandem</u>	541	TCGAAACTCT	GCCACAAGAA	TCCACTGAG	TCTTTGTTTC	TGGAGTATCT	CATTACAAAA	600
<u>Start 2</u>	61	TCGAAACTCT	GCCACAAGAA	TCCACTGAG	TCTTTGTTTC	TGGAGTATCT	CATTACAAAA	600
								120
<u>Start 1</u>	601	610	620	630	640	650	660	
<u>Tandem</u>	601	TTACCGTTGG	GAAGAAGCTC	TGCTATCACT	GGTATCTCA	CATTTTCTCT	AGTAAATATT	660
<u>Start 2</u>	121	TTACCGTTGG	GAAGAAGCTC	TGCTATCACT	GGTATCTCA	CATTTTCTCT	AGTAAATATT	660
								180
<u>Start 1</u>	661	670	680	690	700	710	720	
<u>Tandem</u>	661	CTCGACCAAA	CAGTGTATT	AGACTGACCT	AGCAACACAA	GATTGTTTCC	AGAGATTTTC	720
<u>Start 2</u>	181	CTCGACCAAA	CAGTGTATT	AGACTGACCT	AGCAACACAA	GATTGTTTCC	AGAGATTTTC	720
								240
<u>Start 1</u>	721	730	740	750	760	770	780	
<u>Tandem</u>	721	AGGGTTCCAA	TGGAATTGGA	GAGAGGCTG	TCTCTGTTTC	CGACCATGTC	GTAGGTTTTTC	780
<u>Start 2</u>	241	AGGGTTCCAA	TGGAATTGGA	GAGAGGCTG	TCTCTGTTTC	CGACCATGTC	GTAGGTTTTTC	780
								300
<u>Start 1</u>	781	790	800	810	820	830	840	
<u>Tandem</u>	781	TGGGAGACCT	TTTATATCCA	TATTCGAGA	TACCAACCGG	AGCTTCCAA	GGTTTGAAG	840
<u>Start 2</u>	301	TGGGAGACCT	TTTATATCCA	TATTCGAGA	TACCAACCGG	AGCTTCCAA	GGTTTGAAG	840
								360
<u>Start 1</u>	841	850	860	870	880	890	900	
<u>Tandem</u>	841	AAACCAAGCT	CGAAGACTCC	ACCCGAGAT	ACAAGTGTTTC	TATTGCTCGA	GATTGTGAGA	900
<u>Start 2</u>	361	AAACCAAGCT	CGAAGACTCC	ACCCGAGAT	ACAAGTGTTTC	TATTGCTCGA	GATTGTGAGA	900
								420
<u>Start 1</u>	901	910	920	930	940	950	960	
<u>Tandem</u>	901	GACTCTSAAG	ACGACAAAGT	GTTGACATAG	ATCGAAAGGG	CAGGATGAAA	TAGATTTCAAG	960
<u>Start 2</u>	421	GACTCTSAAG	ACGACAAAGT	GTTGACATAG	ATCGAAAGGG	CAGGATGAAA	TAGATTTCAAG	960
								480
<u>Start 1</u>	961	970	980	990	1000	1010	1020	
<u>Tandem</u>	961	AAAAGGAACT	CTAGCAAGAA	CGAGAAGGTG	TAAAGATGCT	GGAAAATGTT	CTGTACCCCT	1020
<u>Start 2</u>	481	AAAAGGAACT	CTAGCAAGAA	CGAGAAGGTG	TAAAGATGCT	GGAAAATGTT	CTGTACCCCT	1020
								540
<u>Start 1</u>	1021	1025	1025	1025	1025	1025	1025	
<u>Tandem</u>	1021	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	1025
<u>Start 2</u>	541	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	TTTCAAT	545

Obr. 8. sekvence dvou alel *SLG II*. Osekvěnovány byly dva klony z linie Start a jeden klon z linie Tandem. Celé sekvence byly získány u jednoho klonu ze Startu (Start 1) a jednoho klonu z Tandemu. Oba tyto klony jsou stejné (až na několik málo sekvencí na

počátku a konci, což může být pouze chyba ve čtení či kompletování sekvencí). Z druhého klonu linie Start (Start 2) byla získána jen polovina sekvence, která se ovšem nápadně odlišuje od ostatních (bude ještě znovu sekvenována). Černé rámečky označují místa, kde se sekvence shodují u všech tří vzorků.

Diskuse

Pomocí PCR – RFLP je možné rozlišit autoinkompatibilní linie u řepky, což lze úspěšně využívat ve šlechtění. V našich výsledcích byly získány 3 sekvence genu *SLG II* autoinkompatibilních linií a různých odrůd řepky. Nasrallah a kol. (1992) zjistil u přirozeně se vyskytujících variant druhu *Brassica rapa* autoinkompatibilitu spojenou s nízkou expresí genu *SLG* v mnoha autokompatibilních liniích druhu *Brassica napus*. Cabrillac a kol. (1999) našel duplikované geny *SLG* u autokompatibilních linií rostlin druhu *Brassica oleracea* linie S¹⁵ haplotypu.

Alela 10 proto pochází s největší pravděpodobností také z genomu druhu *Brassica oleracea*, neboť byla nalezena v duplikované formě. Goring et al. (1993) našel alelu A¹⁰ genu *SLG I*, která byla na stejném lokusu jako gen *SRK* s jednobazovou delecí. Lze spekulovat, že protein *SLG I* by mohl mít větší afinitu k supresoru než k proteinu *SCR*. Po interakci proteinu *SLG I* se supresorem by mohlo dojít k navázání na *SRK*, které by bez předchozí interakce jinak nebylo možné, a tak došlo k zablokování AI reakce. Nám se podařilo nalézt alelu A¹⁰ genu *SLG I* u všech zkoumaných odrůd, pouze u odrůdy Topas a Regent byla nalezena ještě navíc jiná alela.

Nelze vyloučit možnost, že jako modifikační gen působí některý z S – genů na dominantním S – lokusu. Ačkoli je alela S – lokusu A¹⁰ nefunkční (mutace v *SRK*), gen *SLG* se podle Goring et al. (1993) exprimuje. To by mohlo blokovat recesivní S – haplotypy. Podstata recesivity není zatím známa. Tímto způsobem je možné vysvětlit jak nepřítomnost dominantního *SLG* u AI jedinců, tak výskyt kompatibilních jedinců bez tohoto genu. Pouhá přítomnost funkčního S – lokusu v R1 generaci křížení AI linií s kompatibilní řepkou nemusí znamenat AI fenotyp. Není tedy možné získat pouze AI linie na základě detekce funkčního S – lokusu.

Metody PCR – RFLP se používá k typizaci cílové sekvence určitého genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus. Zaklonování a osekvenování *SLG* genu znamenalo počátek detekce polymorfismu S – lokusu přímo na úrovni DNA. Nám se podařilo zaklonovat a osekvenovat dva klony z linie Start a jeden klon z linie Tandem. Oba tyto klony se jevíly jako shodné až na několik málo sekvencí na počátku, což mohla být chyba ve čtení či kompletování sekvencí. Aminokyselinová sekvence *SLG* genů je

velice polymorfní, ale má vždy v podobné pozici 12 cysteinů. Na každém aminokyselinovém řetězci je několik potenciálních N – glykosilačních míst, z toho 2 místa jsou konzervativní. Tyto výsledky odpovídají i zjištěním Kusaba a kol. (1997). Je proto důležité navrhnout univerzální PCR primery. Byly navrženy 2 typy primerů. Konzervativní úseky napříč celou genovou rodinou podle Brace a kol. (1993). V tomto případě se naamplifikují také homologní sekvence *SRK*, *SLR1*, *SLR2*. Zde není jisté, že detekovaný polymorfismus indikuje odlišnou alelu S – lokusu. Druhý typ primerů byl specificky amplifikující pouze gen *SLG*, zde se ale neamplifikují žádné recesivní alely tohoto genu. Proto byly navrženy také primery pro gen *SLG II*, ty ale nejsou tak specifické jako pro *SLG I*, tyto výsledky, které jsme zjistili odpovídají i pracem Nishio a kol. (1996). Pomocí kombinace těchto primerů je možné naamplifikovat *SLG* geny ve většině S – haplotypů. Výsledky získané touto metodou jsou důvěryhodné, a tak se používá dodnes podle Nasrallah (1985). I nám se podle sekvenčních dat podařilo potvrdit správnost metody PCR – RFLP tím, že se shodovali velikosti fragmentů u klonů genu *SLG*. Výsledkem štěpení PCR produktů u *B. napus* bylo 6-10 fragmentů (to je více než u dihaploidních druhů. Polymorfní fragmenty mezi AI a AK liniemi byly mapovány jako *SLG* specifické STS markery. Podle našich zjištění je ovšem dost možné, že by mohlo jít o geny, které nijak nesouvisí s S – lokusem.

Dvojice primerů PS₅ a PS₁₅ je dobře navržena podle Nishio et al. (1996). Jsou to dlouhé primery (23-27 pb). U většiny dominantních *SLG* genů se komplementární sekvence k primerům liší maximálně o dvě až tři báze (u alely A¹⁰ o tři pb). Mnohem složitější je navržení primerů pro specifickou amplifikaci *SLG II*. S primery PS₃ a PS₂₁ se vedle recesivních *SLG* genů amplifikuje řada sekvencí, některé z nich nemají pravděpodobně žádnou spojitost s S – lokusem. Problémem primerů PS₃ a PS₂₁ je snadná vzájemná tvorba bivalentů, to je ale řešitelné optimalizací metody PCR. Nishio et al. (1996) usuzuje, že při PCR – RFLP jsou jednotlivé recesivní S – hapotypy dobře rozlišitelné. U řepky zůstává pravděpodobně polymorfismus aktivních S – alel maskován za spektrem fragmentů z lokusu S¹⁵. Recesivní alely *SLG* genu nejsou tak polymorfní. V součtu několika štěpných sekvencí proto zůstávají rozdíly snadno skryté.

Podle Sobotky (2001) by možnost, že v AI liniích je funkční právě alela lokusu S¹⁵, to je možné vyloučit vzhledem k různému S – haplotypu jednotlivých AI linií (funkční musí být různé alely S – lokusů).

Podle Sobotky (2001) je testování rozsahu populace kolem sta jedinců neúspěšné v tom, že se nepodařilo získat požadovaný genotyp s kombinací znaků AI a nízkého obsahu glukosinolátů. U všech regenerantů s velmi dobrou úrovní AI reakce byl obsah GLS vždy na podobné úrovni jako u výchozích opavských linií, to je velmi vysoký. Je zde silná vazba mezi těmito znaky, a proto je nutná rozsáhlejší populace, aby se rozbila vazba mezi těmito geny, které to způsobují. Tato populace by měla mít minimálně několik set jedinců. Jako výhodnější se mu zdá, vycházet v prvním kroku z běžné F2 generace a na základě PCR selektovat stovky jedinců krátce po vyklíčení. Výsledkem selekce v F2 generaci by měli být pouze jedinci s genotypem RFFF. Pomocí semenného testu by pak bylo možné ověřit AI fenotyp a následně obsah GSL. V mé práci ale není možné testovat takto rozsáhlou populaci, proto se tento výzkum neprováděl.

Závěr

Metoda PCR –RFLP byla použita s velkou úspěšností pro rozlišení jednotlivých alel genu *SLG II* u jednotlivých zaklonovaných alel i u dihaploidních jedinců i kříženců dvou linií. Délka fragmentů se pokaždé shodovala s velikostí fragmentů odvozených ze sekvencí. Získané sekvence budou sloužit jako podklad pro zvýšení přítomnosti jednotlivých alel genu *SLG* v AI liniích nebo u odrůd řepky a lze tak určit jejich haplotyp. Tato metoda může v budoucnu pomáhat při vývoji nových S – haplotypů a vzniku nových alel v populaci řepky. PCR – RFLP lze používat rutinně pro odlišení S – haplotypů, je však zapotřebí minimálně tří restričních enzymů. My jsme použili pouze restriktázu *Afa I* a *Eco RI* pro *SLG II* a restriktázu *Mbo I* pro gen *SLG I*. Soubor získaných sekvencí genu *SLG* byl použit jako podklad pro výběr vhodného restričního enzymu, aby se usnadnilo rutinní použití metody PCR – RFLP

Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*, Espero publishing, Ústí nad Labem: Ústí nad Labem, 2001. 630 s.
- Cabrillac, D., Delorme, V., Garin, J., Ruffio – Chable, V., Giranlon, J., Dumas, C., Gaude, T., Cock, J. M. *The S¹⁵ self – incompatibility haplotype in Brassica oleracea includes three S gene family members expressed in stigma*. *Plant Cell*, 1999. 11: 971-986.
- Cabrillac, D., Delorme, V., Garin, J., Ruffio-Châble, V., Giranton, J. L., Cock, C. M. *The S15 self-incompatibility haplotype in Brassica oleracea includes three S gene family members*. *Plant Cell*, 1999 May. 11(5): 971-986.
- Cramer, N. *Raps*. Ulmer, Stuttgart, 1990. 145 s.
- Cuřínová, P. *Využití metody PCR – RFLP pro detekci S – haplotypů u řepky: bakalářská práce*. Č. Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2006. 44 s., 1 příl.
- Čurn, V., Sáková, L. *Využití biochemických markerů při hodnocení biodiverzity planých druhů rostlin a řešení taxonomických otázek (Utilization of biochemical markers in biodiversity and taxonomy studies in wild flowers)*. *Sborník Jihočeské univerzity Zemědělské fakulty v Českých Budějovicích*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 1996. Ř. Fytotechnická 13: 23 – 35.
- Diviš, J., a kol. *Pěstování rostlin*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2000. 258 s. ISBN 80-7040-456-6.
- Downey, R. K., Rakow G. F. W. *Rapeseed and mustard*. In: *Principles of cultivar development* (ed. W. R. Fehr), Macmillan, 1987.
- Goring, D. R., Glavin, T. L., Schafer, V., Rothstein, S. J. *Ans receptor kinase gene in self-compatible Brassica napus has a 1-bp deletion*. *Plant Cell*, 1993. 5: 531-539.
- Graman J., Černý, J., Houba, M., Beran, J. *Semenářství (Dodatky k učebním textům)*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1999.
- Hemleben, V. *Molekularbiologie der Pflanzen*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1990.
- Chloupek, O. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Praha: Academia Praha,

1995. 186 s. ISBN 80-200-0207-3.

Káš, J., Pačes, V., Ondřej, M., Petr, J., Maršálek, J., Demnerová, K., Ruml, T., Zdeňková, K., Janotová, P., Roudná, M., Jenč, P., Liptov, J. *Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko - technologická v Praze ve spolupráci s ministerstvem životního prostředí, 2004. s. 29 – 30.

Kučera, V., Vyvadilová, M. *Projekt Česká řepka*. Úroda 11/2003. Ing. Martin Sedláček. s. 12.

Kukolíková, B. *Využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky: Diplomová práce*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2005. 36 s.

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

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

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Daenel, J. *Molecular cell biology*. New York, USA: W. H. Freeman company, 2000. s. 221 – 260.

Lu, D.T., Marty- Mazars, D., Trick, M., Dumas, CH., Heizmann, P. *Pollen – stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SRL glycoproteins*. Plant Cell, 1999. 11: 251 – 262.

Nasrallah, J.B., Kao, T.H., Goldberg, M.L., Nasrallah, M.E. *A cDNA clone encoding an S-locus specific glycoprotein from Brassica oleracea*. Nature, 1985, 318: 263-267.

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

Nishio, T., Hinata, K. *Analysis of S-specific proteins in stigma of Brassica oleracea L. by isoelectric focusing*. Heredity, 1997. 38: 391-396.

Nishio, T., Kusaba, M., Watanabe, M., Hinata, K. *Registration of S alleles in*

Brassica campestris L. by the restriction fragment sizes of SLGs. Theor. Appl. Genet. 1996. 92: 388-394.

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

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

Ondřej, M., Drobník, J. *Transgenozé rostlin.* Praha: Academia Praha, 2002. 316 s. ISBN 80-200-0958-2.

Rod, J. *Šlechtění rostlin.* Praha: Státní zemědělské nakladatelství Praha, 1982. 368 s.

Rosypal, S. *Úvod do molekulární biologie, díl třetí.* Brno: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 1997. 756. s.

Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B. *The male determinat of self incompatibility in Brassica.* Science, 1999. 286, 1697 – 1700.

Sobotka, R. *Analýza genu SLG a jeho využití jako selekčního markeru ve šlechtění řepky olejné: Dizertační práce.* České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2001. 67 s.

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

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J. *Metody molekulární biologie.* Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. *The S receptor kinase determines self – incompatibility in Brassica stigma.* Nature, 2000. 403: 913 – 916.

U, N. *Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of Brassica napus and its peculiar mode of fertilization.* Jpn. J. Bot. 1935. 7: 389-452.

Van Dam-Mieras, M. C. E., de Jeu, W. H., de Vries, J., Currell, B. R., James, J.W., Leach, C. K., Patmore, R. A. *Biotechnologické inovace ve šlechtění plodin.* Nederland: Otevřená univerzita, United Kingdom: Temžská polytechnika, 1991.

371 s.

Vašák, J., a kol. *Intenzivní produkce ozimé řepky*. Zemědělský týdeník, 24. 8. 2006, roč. IX. č. 34. 27 s.

Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. *Methods Enzymol*, 1993. 218: 704-740.

Přílohy

Příloha 1

Izolace genomové DNA (Invisorb Spin Mini Kit – Invitex)

1. 60 mg rostlinného materiálu zhomogenizovat v tekutém dusíku
2. přidat 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy K, zvortexovat a 30 min. inkubovat při 65°C
3. převést lyzační roztok na kolonku, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm
4. k filtrátu přidat 200 µl vázacího pufru a důkladně zvortexovat
5. přenést suspenzi na kolonku a inkubovat 1 min., centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, slít filtrát
6. přidat 550 µl promývacího pufru I a centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, slít filtrát
7. přidat 550 µl promývacího pufru II a centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, slít filtrát, tento krok opakovat 2x, nakonec centrifugovat 2 min. při 12 000rpm pro odstranění zbývajícího ethanolu
8. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 100 µl elučního pufru D, který je předeřhřátý na 65°C, 3 min. inkubovat, centrifugovat 2 min. při 12 000 rpm

Příloha 2

Izolace plazmidové DNA (Invisorb Spin Plasmid Mini Kit – Invitex)

1. 2 μ l plazmidové DNA centrifugovat 1 min. na maximální rychlost, odstranit důkladně supernatant
2. resuspendovat pelet ve 200 μ l resuspendačního roztoku
3. přidat 200 μ l alkalického lyzačního roztoku, 5x převrátit eppendorfku a nechat lyzovat 5 min.
4. přidat 200 μ l neutralizačního roztoku, 4 – 6x převrátit eppendorfku, centrifugovat 5 min. na max. rychlost
5. přenést čirý supernatant 200 μ l na kolonku, přidat 200 μ l vázacího roztoku, 1x převrátit, centrifugovat 1 min. při 8 000 rpm, slít filtrát
6. přidat 750 μ l promývacího pufru, centrifugovat 1 min. při 8 000 rpm, slít filtrát
7. centrifugovat 3 min. na plnou rychlost kvůli odstranění ethanolu
8. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 50 μ l sterilní vody, inkubovat 1 min. při 8 000 rpm

Příloha 3

Eluce fragmentů DNA z agarózového gelu (JETQUICK)

1. z agarózového gelu vyříznout bloček s požadovaným fragmentem DNA
2. na každých 100 mg gelu přidat 300 µl roztoku L1, inkubovat při 50°C 15 min., každé 3 min. protřepávat
3. roztok přenést do kolonek, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, slít filtrát
4. přidat 500 µl roztoku L2, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, slít filtrát
5. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 50 µl sterilní vody, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm

Příloha 4

Klonování (Topo TA cloning for sequencing kit – Invitrogen)

PRVNÍ DEN

1. 2 µl PCR produktu (nesmí být starší než jeden den) + 0,4 µl Salt solution
2. zamíchat, nechat stát 5 min. (větší PCR produkty 20 – 30 min.) při pokojové teplotě
3. přidat 17 µl kompetentních buněk *E.coli* uříznout špičkou, zamíchat
4. 30 min. nechat stát na ledu (je možné i skladování přes noc při –20°C)
5. tepelný šok – 30 sek. ve vodní lázni při 42°C bez míchání a pak 2 min. na ledu
6. přidat 150 µl temperovaného SOC media, promíchat, nenasávat
7. 1hod. třepat při 37°C v hnízdě
8. mezitím rozetřít na misky s LB mediem 40 µl Xgal (sterilní hokejkou) a dát na misky a temperovat na 37°C
9. vylít na misky buňky a pečlivě rozetřít
10. nechat kultivovat při 37°C

DRUHÝ DEN

1. vypíchnout 2 bílé kolonie (obsahují plazmid s produktem) + 3 ml LB media + 12 µl AMP
2. kultivovat 16 hod. při 37°C přes noc

TŘETÍ DEN

1. odebrat 850 µl kultury + 150 µl glycerolu, zamrazit při –80°C pro dlouhodobé uchování
2. izolace plazmidu kitem
3. vyštěpení plazmidu z vektoru *Eco RI*, elektroforéza

Klonovací reakce pro větší PCR produkty

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

Příloha 5

Příprava tekutého LB media

Postup na přípravu 300 ml roztoku

1. 3 g NaCl
2. 3 g Pepton 48602
3. 1,5 g Yeast extract
4. upravíme na výsledné pH 7,2 (7,0 – 7,5)

příloha 6

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

dH ₂ O (doplnit na objem 20 µl)	0 – 9,5 µl
325 ng plazmidové DNA (do 5 kbp)	0,5 – 10,0 µl
1,6 µM primer (M13 reverse, T7)	2,0 µl
DTCS Quick Start Master mix	8,0 µl

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

Cyklus: 96°C 20 sek.
 50°C 20 sek
 60°C 4 min.

Celkem se opakuje 30 cyklů

Příloha 7

Přečištění sekvenační reakce

1. připravit čerstvý roztok stop pufru před každým přečištěním, složení na jednu reakci: 2 μ l 100 mM EDTA, 2 μ l 3M octanu sodného (pH 5,2), 1 μ l glykogenu
2. přidat 60 μ l chlazeného 96% ethanolu
3. centrifugovat 15 min. při 14 000 rpm a při 4°C
4. pipetou odsát supernatant a přidat 200 μ l chlazeného 70% ethanolu, 5 min. při 14 000 rpm a při 4°C
5. pipetou odsát supernatant a pelet nechat uschnout na vzduchu

Příloha 8

Restrikční štěpení PCR produktů

Restrikční štěpení se provádí dle instrukcí v příbalovém letáku jednotlivých enzymů. Většinou provádíme štěpení s 20 µl produktu PCR a 5 U enzymu, reakce probíhá přes noc.

Příloha 9

PCR pro gen SLGII

H ₂ O	18,4 µl
Pufr	2,5 µl
DNT's	2,0 µl
Primery PS ₂₁ + PS ₃	0,2 µl + 0,2 µl
Taq polymeráza	0,2 µl
DNA – templát	1,5 µl

Cyklus: 35x

Denaturace	93°C 1 minuta
Annealing (nasedání primerů)	58°C 2 minuty
Elongace (syntéza řetězce)	72°C 3 minuty

Počáteční denaturace je 93°C 5 min. a konečná elongace 72°C 10 min.

Příloha 10

Příprava agarózového gelu

Tabulka č. 1: složení 1,5% agarózového gelu

objem	agaróza	5 x TBE	voda	ethidium bromid
50ml	0,75 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100ml	1,5 g	20 ml	80 ml	2 µl
200ml	3,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

Tabulka č. 2: složení 1,0% agarózového gelu

objem	agaróza	5x TBE	voda	ethidium bromid
50 ml	0,50 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,0 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	2,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

- rozvařit v mikrovlnné troubě, nesmí být vidět vlákna
- připravit vanu a hřebeny
- zchladit (cca 60°C)
- přidat ethidium bromid
- nalít a špičkou odstranit případné bubliny

Elektroforéza probíhá obvykle 2 hod. při napětí 90 V.

Složení 5x TBE (1 l) pufru

Tris 54 g

kys. boritá 27,5 g

0,5 M EDTA (pH = 8,0) 20 ml