

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Akademický rok: 2017/2018

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Zadávací katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vývoj molekulárních selekčních markerů pro detekci obnovitelů
fertility pro systém CMS Shaan 2A

Autor diplomové práce: Bc. Aneta Karbanová

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

Odborný konzultant diplomové práce: Ing. Irena Jelínková

České Budějovice

2018

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta KARBANOVÁ**
Osobní číslo: **Z16345**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Vývoj molekulárních selekčních markerů pro detekci obnovitelů fertility pro systém CMS Shaan 2A**
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

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

Cílem diplomové práce je analýza vývoj nového molekulárního markeru použitelného pro detekci obnovitelů fertility pro systém cytoplazmatické samčí sterility Shaan 2A u řepky ozimé.

Úvod: stručný nástin molekulárních technik a jejich významu ve šlechtění rostlin.

Cíle práce: definice hypotéz a cílů práce.

Literární přehled: cytoplazmatická samčí sterilita a její význam ve šlechtění řepky, metody detekce cílových genotypů rostlin, metody molekulárního markerování a molekulární přístupy ve šlechtění rostlin, základní aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin.

Materiál a metody: popis a charakteristika analyzovaných genetických zdrojů, izolace DNA a analýzy molekulárních markerů.

Výsledky: vyhodnocení profilů molekulárních markerů, výsledky analýz molekulárních markerů, korelace fenotypu a profilu molekulárních markerů, uspořádání do tabulek, grafů.

Diskuze: porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: **10 - 15 stran**

Rozsah pracovní zprávy: **40 - 50 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

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

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

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

Koh H.J. et al. (2015): Current Technologies in Plant Molecular Breeding. Springer, New York

Schmidt R., Bancroft I. (2011): Genetics and Genomics of the Brassicaceae, Springer, New York

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

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**


Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: **Ing. Irena Jelínková**

Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: **23. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2018**



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvák 1998 370 05 Česká Budějovice



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

V Českých Budějovicích dne 23. února 2017

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vývojem molekulárních selekčních markerů pro detekci obnovitelů fertility pro systém CMS Shaan 2A u řepky pomocí molekulárních technik. V práci jsou popsány použité molekulární techniky, jako je technika izolace DNA, polymerázová řetězová reakce a technika návrhu primerů pro detekci obnovitelů fertility. Byly navrženy specifické primery pro PCR amplifikaci sekvencí genu *Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein* a genu *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein*, které byly následně osekvenovány. Na základě zjištěných sekvenčních odlišností mezi rostlinami, jež byly podle fenotypu určeny jako obnovitelé fertility, sterilními matkami a udržovateli sterility byla navržena metodika pro detekci obnovitelů fertility.

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the development of molecular selection markers for the detection of fertility restorers for CMS Shaan 2A in rape by molecular techniques. The thesis describes molecular techniques such as DNA isolation techniques, polymerase chain reaction and primer design techniques for the detection of fertility restorers. Specific PCR primers for the *Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein* gene and the *Tetratricopeptide repeat (TPR) -like superfamily protein* gene sequence amplification have been designed and amplicons have been sequenced. On the basis of the sequence differences between plants with with fertility restorer phenotype and CMS phenotype the technique for fertility restorer detection was designed.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce.

V Českých Budějovicích dne :

.....
Bc. Aneta Karbanová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych velice ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D a Ing. Ireně Jelínkové za odborné vedení, průběžné konzultace, trpělivost a ochotu během vypracování mé diplomové práce a za poskytování věcných připomínek a cenných rad i během celé doby studia.

Velké poděkování patří mé rodině a mým blízkým, kteří mě během celého studia podporovali.

OBSAH

1. MOTIVACE A CÍL PRÁCE	8
2. ÚVOD.....	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Řepka olejka (<i>Brassica napus</i>).....	10
3.1.1 Biologie řepky	10
3.1.2 Genetický původ řepky	14
3.1.3 Historie šlechtění řepky	15
3.1.4 Šlechtitelské úspěchy	15
3.2 Molekulární markery.....	16
3.2.1 Význam molekulárních markerů ve šlechtění	16
3.3 Cytoplazmatická samčí sterilita	16
3.3.1 Shaan 2A CMS systém	18
3.3.2 Polima CMS systém	19
3.3.3 Ogura CMS systém	19
3.4 Metody	20
3.4.1 Izolace DNA	20
3.4.2 Polymerázová řetězová reakce	20
3.4.4 Sangerova metoda sekvenování	21
4. Materiál a metody.....	23
4.1 Izolace DNA	24
4.2 Měření koncentrace DNA	25
4.3 Návrh primerů.....	26
4.4 Polymerázová řetězová reakce	27
4.5 Příprava agarózového gelu	28
4.6 Elektroforéza	29
4.7 Primery	30
4.8 Sekvenování.....	31
5. Výsledky.....	32
5.1 Izolace DNA z děložních listů rostlin s určeným fenotypem	32
5.2 Primery	33
5.3 Sekvenace genu Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	35
5.4 Sekvenace genu Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein.....	40
5.5 Návrh primerů – markerů pro detekci obnovitele fertility v systému CMS – Shaan 2A.....	42
6. DISKUZE	46
7. ZÁVĚR	48
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

1. MOTIVACE A CÍL PRÁCE

Brukev řepka olejka je nejvýznamnější olejinou a jednou z nejvýznamnějších plodin pěstovaných na území České republiky. V České republice se šlechtí liniové odrůdy řepky, nebo se využívá heterozní šlechtění, jehož výsledkem jsou buď hybridní odrůdy, nebo syntetické populace řepky. Průměrný podíl hybridních odrůd řepky pěstovaných v ČR se pro rok 2017 pohyboval kolem 87,8 %.

Pro šlechtění hybridních odrůd je nutná existence funkční metodiky pro detekci systémů zábrany samosprášení a obnovy fertility. V České Republice dosud byly šlechtěny hybridní odrůdy za použití systému Ogu-INRA. V zahraničí, zejména v Číně, však jsou běžně využívány i jiné systémy cytoplazmatické samčí sterility (Shaan 2A, Polima). Technika molekulární detekce obnovitelů u CMS systému Shaan 2A je šlechtiteli využívána, avšak je založena na genovém markeru, který je pravděpodobně ve vazbě s genem obnovujícím fertilitu a není 100% spolehlivá. Cílem této práce je sekvenace dalších genů, které by mohly být v užší vazbě s genem obnovujícím fertilitu a navržení spolehlivějšího markeru pro detekci obnovitele.

Hypotéza

V oblasti chromozomu, kde se pravděpodobně nachází gen obnovy fertility v CMS systému Shaan 2A jsou další geny, které jsou vhodnými molekulárními markery pro detekci obnovitele fertility.

Na základě sekvenování těchto genů u fenotypově identifikovaných obnovitelů fertility a sterilních matek lze vytipovat sekvence použitelné jako spolehlivý molekulární marker pro rychlou detekci obnovitele fertility u řepky

Cíle práce

- 1) Návrh primerů ohraničující maximální možnou oblast genů vytipovaných na pracovišti CNAP, Dept. of Biology, University of York
- 2) Amplifikace těchto oblastí a následná sekvenace službou
- 3) Alignment získaných sekvencí a vytipování oblastí, které jsou odlišné u obnovitelů fertility a sterilních matek
- 4) Návrh nového detekčního systému pro obnovitele fertility v CMS systému Shaan 2A a jeho optimalizace

2. ÚVOD

Řepka je bezesporu nejvýznamnější olejninou České republiky. V České republice je po pšenici nejpěstovanější plodinou a z olejnin dokonce hlavní pěstovanou plodinou s 95 procentním podílem z celkové osevní plochy olejnin (Baranyk a Fábry, 2007). Díky vysoké intenzitě pěstování patří Česká republika dokonce mezi pět největších pěstitelů řepky v EU vůbec a zaujímá desáté místo světového pořadí (FAO, 2014). V současné době se řepka dokonce i ve světovém měřítku řadí výměrou ploch olejnin na druhé místo hned za sóju (FAO, 2008). Podle Českého statistického úřadu se sklizeň řepky v České republice za rok 2017 pohybovala kolem 1 146 224 tun (ČSÚ, 2017).

V České republice se šlechtí liniové odrůdy řepky, nebo se využívá heterozní šlechtění, jehož výsledkem jsou buď hybridní odrůdy, nebo syntetické populace řepky. Průměrný podíl hybridních řepok v ČR se pro rok 2017 pohyboval kolem 87,8 %. Mezi nově registrované odrůdy řepky pro rok 2016/2017 řadíme například hybridní odrůdy ACAPULCO, ALICANTE, ALLISON, ATORA, KUGA, DK EXMORE a mezi liniové například odrůdy VAPIANO, ZAKARI CS a OREX (Baranyk et al., 2017). Výhodou hybridů oproti liniovým odrůdám je vyšší výnos semene, jenž je dosahován díky heteroznímu efektu, dobrá zimovzdornost, nízká citlivost k nepříznivému počasí, více času při výsevu, neboť restaurované hybridní odrůdy jsou v podzimním období velmi vzrůstné a vitální. Nevýhodou hybridů je nutná existence funkčního systému zábrany samosprášení a obnovy fertility (SPZO, 2001).

Výnos řepky a mnoho kvalitativních parametrů bylo vylepšeno, zejména prostřednictvím množení hybridů (Tian, 1997). Produkce hybridních semen řepky je většinou založena na bázi cytoplazmatické (CMS) nebo genové (GMS) samčí sterility a zřídka na vlastní autoinkompatibilitě (SI), (Kučera et al., 2007). V současné době se šlechtitelská činnost stále více opírá o nové techniky molekulární biologie, které výrazně urychlují šlechtitelské postupy. Největší snaha se upírá k identifikaci ekonomicky významných znaků řepky a tvorbě jejich markerů. Takovéto selekční markery otevírají cestu k jednoduché a levné identifikaci požadovaných znaků pomocí PCR (O'Neill et al., 2003; Yu et al., 2007).

Cílem této práce je proto vývoj molekulárních selekčních markerů pro detekci obnovitelů fertility pro systém CMS Shaan 2A využitelných ve šlechtění řepky. Detekce je prováděna pomocí molekulárních technik, především je založena na PCR detekci přítomnosti specifických fragmentů markerových genů.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Řepka olejka (*Brassica napus*)

3.1.1 Biologie řepky

Brukev řepka olejka (*Brassica napus* subs. *napus*) je poměrně mladá olejnina mírného pásma. Jedná se o jednoletou statnou bylinu dorůstající od 50 do 220 cm výšky (Vašák et al., 2000). Přímá tmavě zelená až modrozelená lodyha nese přisedlé kopinaté listy bez trichomů. Naopak spodní listová růžice je složena z řapíkatých listů s trichomy. Rostlina vytváří jeden hlavní kořen, který je mohutný a kuželovitý (Hejný a Slavík, 2003). Řepka je převážně samosprašná, nicméně podíl cizosprašení bývá relativně vysoký kolem 7-70% (Vašák et al., 2000). Řepka je rostlina včelomilná, včely se na opylování podílí více jak z 90 %, zbylý podíl připadá hlavně větru (Hejný a Slavík, 2003). Květenstvím je hrozen. Řepka kvete výrazně žlutou barvou po dobu 20 - 25 dní. V našich podmínkách se tak obvykle děje v květnu. Plodem je dvouřadá šešule. Semena jsou kulatá červenohnědá až modrošedá, některé odrůdy mohou být i žlutosemenné (Obr. 1), (Köhler, 1897).

Brukev řepka olejka je řazena do čeledi *Brassicaceae* – brukvovité (Tab. 1), (Dixon, 2007). Jedná se o velkou čeleď rostlin zahrnující více než 4000 druhů včetně několika významných zemědělských plodin, jako právě *Brassica napus*, *Brassica oleracea* a *Armoracia rusticana*, okrasných rostlin, např. *Aubrieta*, *Iberis*, *Lunaria*, *Arabis*, *Draba*, dokonce i modelových organismů v rostlinných vědách jako např. *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, *Arabis alpina* (Paterson et al., 2001).

Tabulka 1: Zařazení řepky do systému

Říše	<i>Plantae</i>
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>
Třída	<i>Rosopsida</i>
Řád	<i>Brassicales</i>
Čeleď	<i>Brassicaceae</i>
Rod	<i>Brassica</i>
Druh	<i>Brassica napus</i>
Poddruh	<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i>

Zdroj: Hejný a Slavík, 2003



Obrázek 1: *Brassica napus* subs. *napus* (Köhler, 1897)

Řepka se pěstuje ve dvou formách, a to ve formě ozimé (hlavně EU) a ve formě jarní – typ Canola (hlavně Kanada, Indie, Austrálie, USA), (Bečka et al., 2007). V České republice, stejně tak jako v západní a střední Evropě, se pěstuje téměř výhradně ozimá forma řepky. Jarní řepka je pak významnou plodinou v jihovýchodní Asii, ale také severnějších a drsnějších oblastech Kanady, Švédska, Finska, Ruska, na Ukrajině a také ve středoasijských státech (Friedt et al., 2007). Svět produkoval k roku 2016 celkem 69 milionů tun řepkového semene na 34 milionech ha. Hlavním producentem je EU – produkce 22 288 526 tun, druhá je Kanada s produkcí asi 18 423 000 tun, následuje Čína s produkcí 15 281 624 tun (FAO, 2017). Česká republika v roce 2016 zaujímal plochu 392 991 ha řepky a sklizeň představovala 1 359 125 tun. Největší část této plochy tvoří Středočeský kraj – 83 837 ha, následuje Jihočeský kraj s 43 267 ha (Tab. 2).

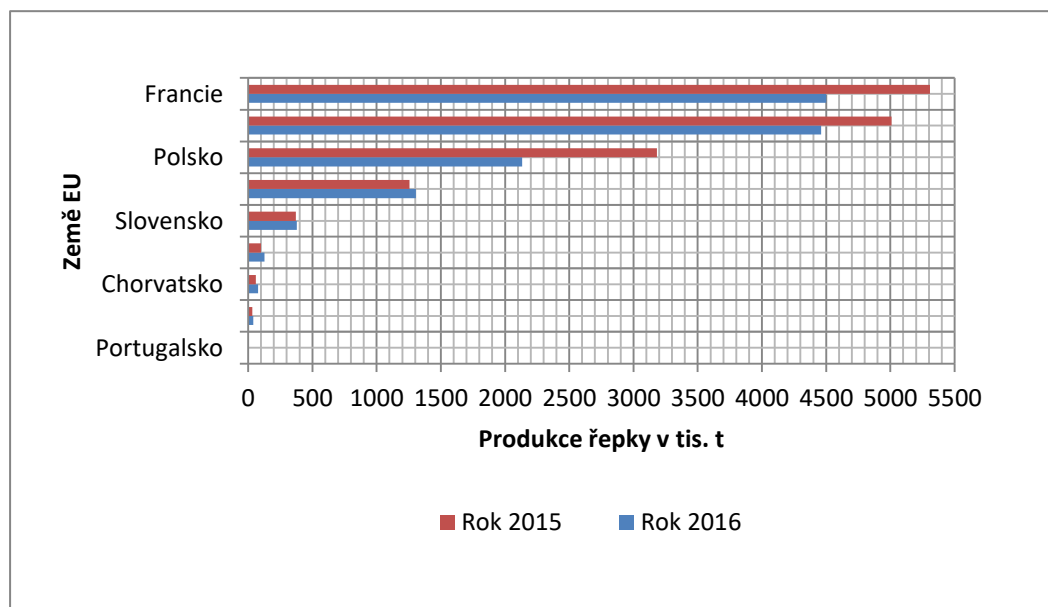
Tabulka 2: Hektarové výnosy a osevní plochy řepky ve vybraných krajích ČR v roce 2016

ČR, kraje	Plocha v ha	Výnos v t/ha	Sklizeň v tunách
Česká republika	392 991	3,46	1 359 125
Hl. m. Praha	2 015	3,67	7 401
Středočeský	83 837	3,50	293 725
Jihočeský	43 267	3,30	142 842
Plzeňský	31 281	3,36	105 035
Královéhradecký	23 527	3,51	82 594
Pardubický	28 116	3,45	97 008
Vysočina	40 863	3,29	134 327

Zdroj: ČSÚ, 2018

Co se týče produkce řepky v Evropě v roce 2016, byla největší produkce zaznamenána ve Francii a to kolem 4 500 000 tun, následuje Německo s produkcí 4 462 000 tun (Graf 1).

Graf 1: Produkce řepky ve vybraných zemích EU v letech 2015 a 2016

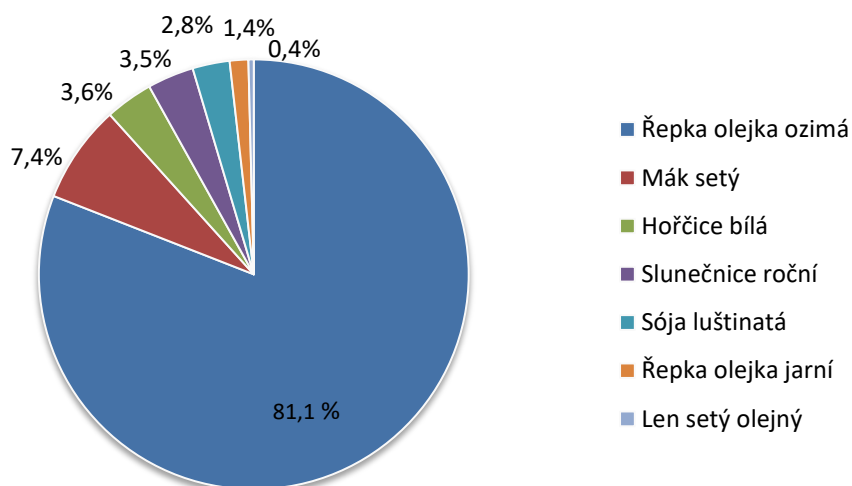


Zdroj: ADM Germany GmbH, 2016

Řepku lze úspěšně pěstovat od nížin až do nadmořských výšek kolem 700 m. Pro pěstování řepky jsou nejvhodnější: nadmořské výšky 400-600 m, oblasti s průměrnými ročními teplotami 6,5-8,5°C a s ročním srážkovým úhrnem 550-750 mm, půdy lehké až střední, písčité až hlinité, oblasti, které zaručují dobré přezimování (Bečka et al., 2007). Současnou odrůdovou skladbu řepky ozimé tvoří pět skupin odrůd: liniové odrůdy, pylově fertilní hybridy, pylově sterilní hybridy/sdružené odrůdy, tříliniové hybridy a topcross hybridy. Téměř všechny odrůdy jsou určeny pro produkci semene (Baranyk et al., 2017).

Řepka je bezpochyby nejvýznamnější olejninou České republiky. Z olejnin je dokonce nejpěstovanější plodinou s nejvyšším procentním podílem z celkové osevní plochy olejnin (Graf 2). V současné době se dokonce i ve světovém měřítku řepka řadí výměrou ploch v rámci olejnin na druhé místo hned za sóju (Tab. 3), (Baranyk a Fábry, 2007).

Graf 2: Zastoupení jednotlivých druhů na celkové ploše olejnin v roce 2015



Zdroj: ČSÚ, 2015

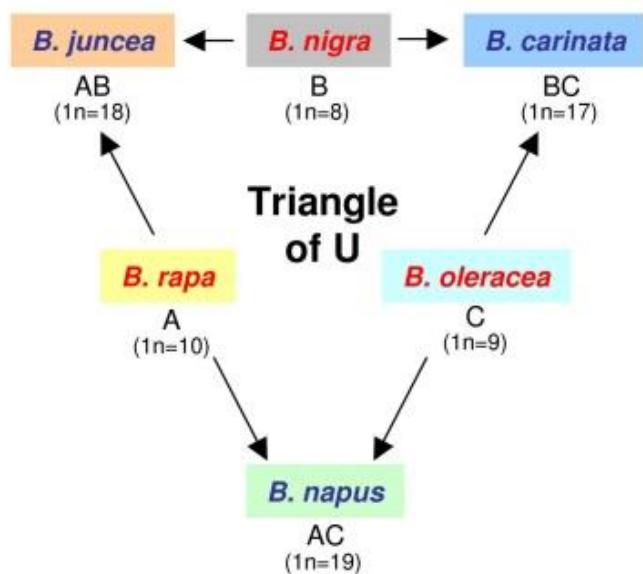
Tabulka 3: Světová výměra a produkce vybraných nejvíce pěstovaných druhů olejnin v letech 2012 - 2017

Plodina	Ukazatel	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17
Sója	Výměra (mil. ha)	109,78	113,09	118,13	120,04	121,83
	Produkce (mil. t)	268,82	283,15	318,68	313,31	338
Řepka	Výměra (mil. ha)	36,18	36,23	35,82	34,1	33,58
	Produkce (mil. t)	63,62	71,96	71,9	70,24	67,76
Slunečnice	Výměra (mil. ha)	23,46	24,14	23,15	23,46	24,77
	Produkce (mil. t)	35,52	42,35	39,99	40,4	44,31

Zdroj: USDA, Oilseeds:World Markets and Trade, 2017

3.1.2 Genetický původ řepky

Řepka je přirozený autoallotetraploid vzniklý spontánní hybridizací dvou druhů *Brassica oleracea* $2n=18$ a *Brassica rapa* $2n=20$ a polyploidizací (Obr. 2), (Friedt et al., 2007). Základní dogma vzniku řepky jako první popsal v roce 1935 korejský botanik Woo Jang-choon, ve vědeckém světě známý pod jménem U (1935). Ten ve svých pracích navázal na hybridizační experimenty Morinagy (1929 a, b, c; 1933; 1934) a potvrdil hybridní původ řepky. 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 (Chloupek, 2008). Doposud u řepky nebyl nalezen planý předek, jde o fylogeneticky velmi mladý druh. Allender a King (2010) a Zamani-Nour et al. (2012) uvádějí vznik druhu před 500 lety, naopak Cheung et al. (2009) se odkazují na výsledky fylogenetických analýz a uvádějí, že ke zkřížení těchto dvou druhů došlo již před méně než 10 000 lety. Původní výskyt druhu *Brassica napus* lze dohledat v jižní Evropě a Středozeří, kde mají výrazný rozsah rodičovské taxony (Song a Osborne, 1992).



Obrázek 2: Schéma vzniku druhu *Brassica napus* (U, 1935)

3.1.3 Historie šlechtění řepky

Na našem území se předpokládá začátek pěstování již v 8. - 10. století n. l. V období středověku byla semena řepky využívána pro výrobu olejů na svícení či pro mydlářství. Od roku 1942 je řepka v Čechách pěstována ve velkém rozsahu (Baranyk a Fábry, 2007).

Počátky šlechtění této olejninu v Československu se datují do období první republiky. Význam řepky v té době byl jen malý. Od roku 1960 se prováděly práce v oblasti šlechtění řepky na zlepšení zimovzdornosti rostlin a nepukavosti šešulí, možném snížení obsahu kyseliny erukové. Na přelomu 60. a 70. let byly prováděny úvodní studie ve směru využití heteroze u řepky. Počínaje rokem 1985 byl zahájen výzkum autoinkompatibility u ozimé řepky.

3.1.4 Šlechtitelské úspěchy

Rostliny řepky obsahují v semenech přirozeně velké množství kyseliny erukové. Tato látka je velmi hořká a může ve větších dávkách způsobit poruchy kardiovaskulárního systému. Až v 70. letech se šlechtěním dosáhlo výrazného snížení obsahu kyseliny erukové v řepkovém oleji (Downey, 1990).

Dalším šlechtitelským úspěchem bylo vyšlechtění odrůd s nízkým obsahem glukosinolátů. Nebezpečí glukosinolátů spočívá v jejich přeměně na toxické látky způsobující poškození jater a ledvin při trávení (Friedt et al., 2007).

Po objevení systémů řízeného opylení (jaderné samčí sterility GMS, cytoplazmatické samčí sterility CMS a autoinkompatibility AI) se hlavní záměry šlechtitelů přesunuly na vytváření hybridních odrůd. Jejich výhodou je především heterozní efekt, vysoký množitelký koeficient a existence geneticky podmíněných autosterilních systémů (Allender a King, 2010).

V současné době se šlechtitelská činnost stále více opírá o nové techniky molekulární biologie, které výrazně urychlují šlechtitelské postupy. Největší snaha se upírá k identifikaci ekonomicky významných znaků řepky a tvorbě jejich markerů. Takovéto selekční markery otevírají cestu k jednoduché a levné identifikaci požadovaných znaků pomocí PCR (O'Neill et al., 2003; Yu et al., 2007).

3.2 Molekulární markery

3.2.1 Význam molekulárních markerů ve šlechtění

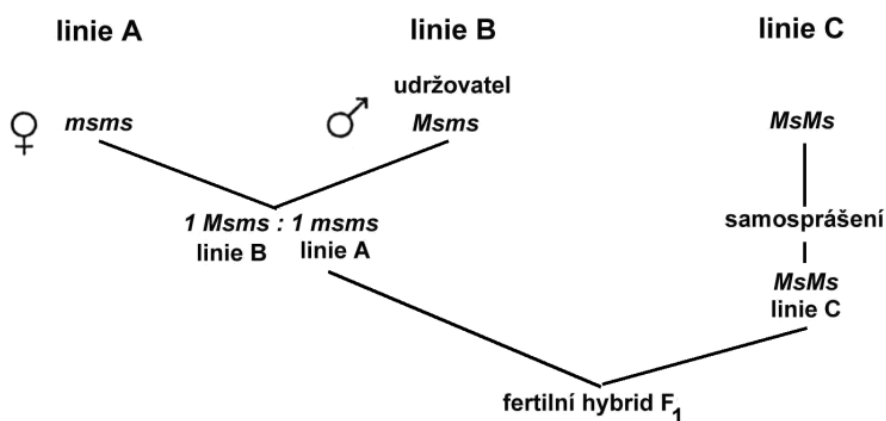
Molekulární marker neboli signální gen je označení pro znak, který má jasný fenotypový projev a je jednoduše dědičně založen. Musí být zabezpečeno spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvalitativními nebo kvantitativními znaky (Čurn a Sáková, 1996). Díky vysokému a rychlému nárůstu počtu odrůd řepky, klesla i schopnost jejich identifikace pouze na základě morfologických znaků (UPOV, 2002). K výraznému posunu v oblasti šlechtění došlo s nástupem právě molekulárních markerů, detekujících DNA polymorfismy s vysokou vypovídací schopností, které umožnily lepší porozumění genetické struktury rodičovských komponent vhodných pro produkci F1 hybridů (O'Neill et al., 2003; Yu et al., 2007). Ve srovnání s morfologickými znaky mají molekulární markery celou řadu výhod a jsou úspěšně používány při určování pravosti odrůd, kontrole odrůdové čistoty hybridních odrůd, ale i při detekci transgenů. Jsou také vhodným pomocníkem k porozumění genetického toku, i stupně prokřížení a hodnocení jednotlivých odrůd (Rao a Hodgkin, 2002). Markerovací systémy se odlišují v obsahu informací, počtu následných polymorfismů, stupni automatizace, pracnosti a výši finančních nákladů. Nejčastěji používanými markery pro tyto účely jsou např. SSR, ISSR, AFLP, RFLP, RAPD, SNP atd. Markery RFLP a RAPD jsou již méně využívané metody (Čurn a Žaludová, 2007).

3.3 Cytoplazmatická samčí sterilita

Cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) je definována jako vlastnost ve vyšších rostlinách přenášená po mateřské linii, jež vyvolává neschopnost produkovat funkční pyl (samčí gamety) u jedinců jiných hermafroditických druhů. Samčí sterilita vyvolaná cytoplazmatickým účinkem může být potlačována jadernými geny, tyto geny proto nazýváme obnoviteli fertility (Rf), (Hanson a Bentolila, 2004).

Cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) je běžným jevem u planě rostoucích rostlin. Její příčinou jsou různé poruchy procesu mikrosporogeneze nebo mikrogametogeneze. Takovéto rostliny následně nevytváří pyl nebo tvoří pyl nefunkční. Fenotypově se tyto rostliny projevují deformací nebo úplnou absencí prašníků. Některé CMS systémy se dnes široce využívají u komerčních plodin jako obrana proti samoopylení při tvorbě hybridního osiva (Chase, 2006). Pylově sterilní rostliny mají určitý typ cytoplazmy (plazmotyp) s faktory (S), zatímco normální fertilní rostliny mají plazmotyp s faktory označenými (N) nebo (F), (Řepková a Relichová, 2001).

Cytoplazmatická samčí sterilita je děděna vždy maternálně, jelikož závisí pouze na faktorech v cytoplazmě. Určujícím faktorem jsou geny řídící samčí plodnost v mitochondriální DNA. Při mutaci těchto genů rostliny ztrácejí schopnost tvořit pyl nebo tvoří pyl nefunkční. Kromě samčí sterility může změna těchto mitochondriálních genů vést i k významným fenotypovým změnám. Funkce mutovaných mitochondriálních genů pro samčí fertilitu může být nahrazena jadernými geny stejného působení. Takovéto geny se nazývají obnovitelé fertility a jsou přítomny v jádře jako alelové páry. Alela neschopná obnovit fertilitu je obvykle recesivního typu a označuje se jako *rf* nebo *ms*. Naopak dominantní alela *Rf* nebo *Ms* obnovuje samčí plodnost (Obr. 3), (Chase, 2006; Budar a Berthomé 2007; Delourme a Budar, 1999; Bock a Knoop, 2012; Gupta et al., 2009).



Obrázek 3: Schéma získání hybridů s využitím CMS (MZe, 2006)

3.3.1 Shaan 2A CMS systém

CMS linie Shaan 2A byla vyšlechtěna čínským vědcem Li Dianrongem (Li et al., 1993). Byla vyšlechtěna opakovaným zpětným křížením s polosterilními rostlinami jako mateřskými a s inbrední linií Shaan 2B jako opakujícími se otcovskými rostlinami. Samčí sterilita Shaan 2A CMS byla udržována otcovskou linií Shaan 2B (Singh, 1991).

V České republice je již v hybridním šlechtění řepky olejky používáno několik CMS systémů jako je OguINRA, MSL a Pol a registrovány a šlechtěny komerční odrůdy založené na Ogu-INRA, MSL and Safecross MS. V Číně se vyskytuje 70% odrůd řepky, jež jsou založené na CMS, především na Pol systému nebo Shaan 2A systému (Zhao et al. 2010).

V Evropě dosud nebyla vyšlechtěna žádná hybridní odrůda řepky olejky založená na Shaan 2A CMS systému. Záměrem českých šlechtitelů je produkovat nové, vylepšené odrůdy řepky na základě tohoto CMS systému. Byly analyzovány sterilní linie Shaan 2A CMS (*S; rf/rf*), příslušní udržovatelé sterility (*N; rf/rf*) a obnovitelé fertility (*S; Rf/Rf*) na molekulární úrovni pro přítomnost funkční CMS cytoplazmy. Byly získány dva nové primerové páry pokrývající gen spojený s CMS (*orf224-1*), jež byly přítomné v Shaan 2A CMS linii a byla úspěšně vyhodnocena selekční schopnost vyvinutých primerů. Tyto primery mohou být použity pro brzký výběr rostlin s funkčním Shaan 2A CMS systémem ve šlechtitelských programech (Havlíčková et al., 2012).

3.3.2 Polima CMS systém

CMS linie Polima byla poprvé objevena profesorem Fu v roce 1972 (Fu et al., 1990). Byla to první CMS linie řepky, která byla již rozsáhle používána při výrobě hybridních semen řepky a mnoha druhů brukvovité zeleniny, protože její sterilita byla stálá a kompletní (Liu et al., 1998).

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

Někteří vědci si mysleli, že CMS Shaan 2A je dříve známý CMS Polima. Ke zjištění toho, zda jsou Polima CMS a Shaan 2A stejné linie CMS, byly porovnávány sekvence mitochondriálního genu spojeného s CMS. Výsledky ukázaly, že *orf224-1* v Shaan 2A CMS cytoplazmě má sekvenci homologní s *orf224* v Polima CMS cytoplazmě. Bylo prokázáno, že CMS linie Polima a Shaan 2A nesly odlišné CMS geny. Tyto výsledky ukázaly, že Polima a Shaan 2A nebyly stejné CMS linie (Liu et al., 1998).

3.3.3 Ogura CMS systém

Další významná forma CMS nazývaná ogu nebo Ogura je založena na použití cytoplazmy z ředkve. Ogura CMS byla tedy původně popsána v ředkvi (*R. sativus*), je ale také široce používána u *B. oleracea*, *B. juncea* a *B. napus* (Ogura 1968). Ogura (1968) přenesl mezidruhovým křížením jádro *B. oleracea* do cytoplazmy *Raphanus sativum* obsahující faktory samčí sterility. Jako obnovitel fertility byl identifikován gen *Rfo*. Studie ukázaly, že působení genu *Rfo* je na translační úrovni (Grelon et al 1994). Evropští vědci zavedli CMS Ogura do *B. napus* intergenerickou hybridizací a opakovaným zpětným křížením (Bannerot et al., 1974). Výsledné aloplazmatické linie *B. napus* pak vykazovaly samčí sterilitu (Pelletier et al., 1983).

3.4 Metody

3.4.1 Izolace DNA

Izolace CTAB slouží k extrakci většího množství DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy. Tato metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který se při vysoké koncentraci solí rozpouští (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženiny. CTAB současně působí jako detergentní činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Další modifikací této izolace je přidání CTAB-PVP. Přidání PVP odstraňuje kontaminanty a umožňuje tak získání čisté a kvalitnější DNA (Williams et al., 1992; Borges, 2009; Murray a Thompson, 1980).

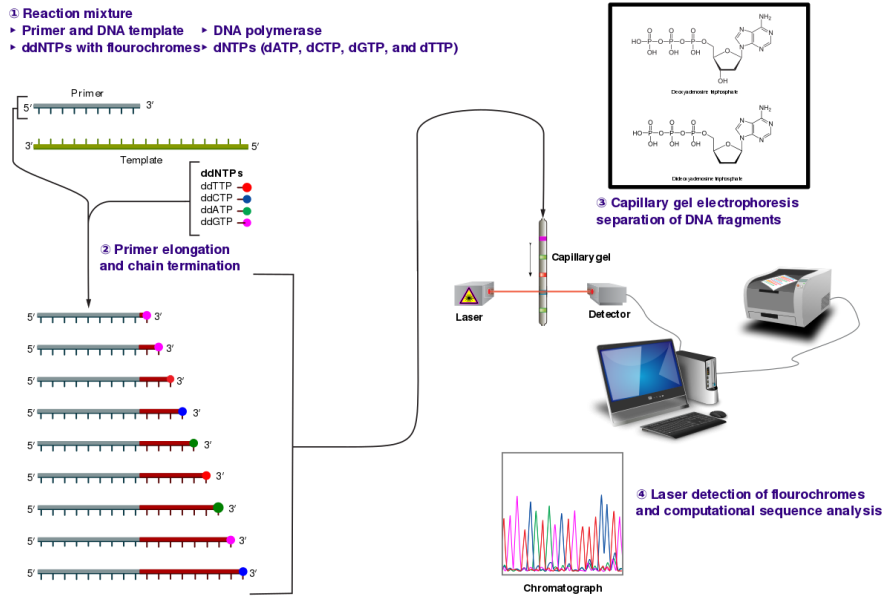
3.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR byla popsána v roce 1984 (Saiki et al., 1988). Zavedení a rychlý rozvoj této techniky na přelomu 80. a 90. let minulého století výrazně zjednodušil řadu protokolů používaných v molekulární biologii. PCR umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA v libovolném množství in vitro, což je jednou z jejích výhod (Šmarda et al., 2005).

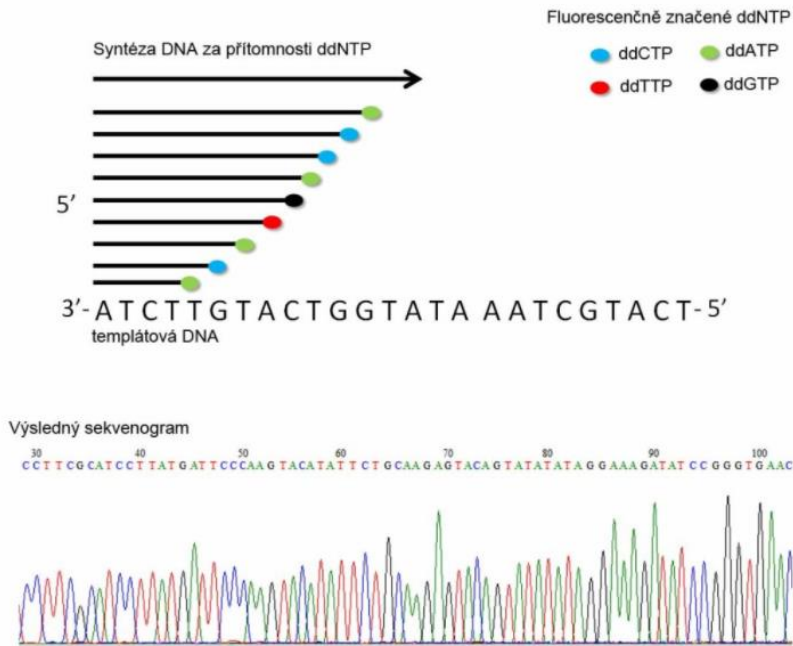
Principem této metody je amplifikace úseku jaderné DNA, pokud známe nukleotidové sekvence ležící v blízkosti naší cílové oblasti – tzv. primery. Primery jsou uměle nasyntetizované oligonukleotidy (10-30 bází dlouhé), které jsou komplementární k sekvencím dsDNA. Při PCR se cyklicky opakuje enzymová syntéza nových řetězců úseků dsDNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě. Po přidání DNA- polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou řetězcích proti směru. K syntéze DNA se používá většinou *Taq* DNA-polymeráza, která byla poprvé izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Je specifická tím, že odolává vysokým teplotám, při nichž už DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu a fragmenty DNA se množí exponenciální řadou (Horáček, 2008).

3.4.4 Sangerova metoda sekvenování

Sangerova metoda, označována také jako enzymová sekvenace, je považována za nejčastěji používanou sekvenační technologii založenou na elektroforéze. Tato metoda je založena na sekvenaci pomocí detekce ukončení prodlužujícího se vlákna DNA. K tomuto ukončení vlákna DNA se využívá dideoxynukleotid (Jarvie, 2005). Na začátku experimentu je potřeba příprava tzv. DNA knihovny. Řetězec DNA je sestřižen na kratší úseky (Sanger et al., 1977). Dalším krokem experimentu je navázání radioaktivně značeného primeru, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa a je tedy výchozím bodem pro syntézu nového vlákna (Zvárová a Mazura, 2012). Kromě toho, že ddNTPs obsahují na 3' uhlíku vodík hydroxylové skupiny, jsou ddNTPs v podstatě stejné jako deoxynukleotidy (dNTPs). Jsou-li tyto modifikované nukleotidy začleněny do sekvence, znemožní vytvoření fosfodiesterové vazby s dalším nukleotidem, čímž ukončuje prodlužující se řetězec DNA (França et al., 2002). Sekvenace probíhá ve čtyřech oddělených zkumavkách, do kterých je přidána reakční směs obsahující primery, templát, DNA polymeráza, fluorescenčně značené dNTPs a přidané ddNTPs. V každé ze čtyř reakčních směsí je přítomen jeden charakteristický ddNTP – ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP. Aby mohla zároveň probíhat i klasická syntéza DNA, jsou ddNTPs ve směsi v nízké koncentraci (poměr ddNTP : dNTP zpravidla odpovídá 1 : 100). Výsledkem reakce jsou fragmenty DNA o různé délce, zakončené fluorescenčně značenými ddNTPs. Fragmenty jsou denaturovány a roztříděny podle velikosti elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (každá reakční směs má svou dráhu). Po ozáření vzniká obraz s typickými proužky, ze kterých lze odvodit sekvenci DNA (Snustad et al., 2009). Modernější modifikace této metody umožňuje sekvenaci v jedné reakci a využívá fluorescenčního značení na místo radioaktivního jako v tradiční metodice. Fluorescenční značky se připojují na 3' konce dideoxynukleotidů (ddNTP). Pro každý ddNTP můžeme použít jiný fluochrom (Obr. 4, 5), (Prober et al., 1987).



Obrázek 4: Sangerova metoda (Estevezj, 2012)



Obrázek 5: Sangerova metoda sekvenování (labguide.cz)

4. Materiál a metody

Pro analýzu byly použity soubory rostlin řepky vypěstované z osiva získaného z VÚRV Praha - Ruzyně. Na základě fenotypizace byly vybrány 4 genotypy, které byly vytipovány jako obnovitelé fertility (Rf), 8 sterilních matek, 3 genotypy, které vznikly křížením sterilní matky a běžné liniové odrůdy a 4 genotypy, které byly vytipovány jako udržovatelé sterility v systému Shaan 2A (Tab. 4).

Tabulka 4: Přehled komponentů pro systém sterility Shaan 2A

Číslo vzorku	Označení	Specifikace
1	S5	Obnovitel fertility pro Shaan 2A
2	S6	Obnovitel fertility pro Shaan 2A
3	S8	Obnovitel fertility pro Shaan 2A
4	S2 x OP-4	CMS matka Shaan 2A
5	S2	CMS matka Shaan 2A
6	S2 x OP-4	CMS matka Shaan 2A
7	S2	CMS matka Shaan 2A
8	S3 x OP-1	CMS matka Shaan 2A
9	S3	CMS matka Shaan 2A
10	S3 x OP-1	CMS matka Shaan 2A
11	S3	CMS matka Shaan 2A
12	S2 x Californium	F1 hybrid CMS matka x běžná linie
13	S3 x Californium	F1 hybrid CMS matka x běžná linie
14	S3 x OP-5607	F1 hybrid CMS matka x běžná linie
15	OP-1	Udržovatel sterility pro S3
16	OP-1	Udržovatel sterility pro S3
17	OP-4	Udržovatel sterility pro S3
18	OP-4	Udržovatel sterility pro S3
19	S9	Obnovitel fertility pro Shaan 2A

4.1 Izolace DNA

DNA jsem izolovala z děložních listů řepky, které jsem ihned po odběru zmrazila na -20°C. K vlastní izolaci DNA jsem použila pro řepku modifikovanou metodu pomocí CTAB-PVP.

Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB-PVP

Chemikálie pro izolaci DNA:

Tris (hydroxymethyl) aminomethan TRIS, Chlorid sodný NaCl, Kys. ethylendiamintetraoctová EDTA, Hexadecyltrimethylamonium bromid CTAB, Polyvinylpyrolidon PVP, Merkaptoethanol, Chloroform, Ethanol 75 %, Isopropanol

Postup:

- 1) nejdříve jsem sterilní pinzetou odebrala 20-30 mg rostlinného materiálu (čerstvé nebo zmražené listy řepky) a dala do mikrocentrifugační zkumavky
- 2) zhomogenizovala jsem materiál pomocí třecího tloučku
- 3) do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky jsem dala 500 µl extrakčního pufru (495 µl 2% CTAB PVP + 5 µl β-merkaptoethanol) a předeřhřála na 65 °C
- 4) přidala zhomogenizovaný materiál
- 5) poté jsem nechala 5 minut inkubovat při 65 °C, během inkubace jednou lehce promíchala
- 6) dále jsem přidala 500 µl směsi chloroformu-IAA a 5 minut protřepávala
- 7) centrifugovala 5 minut na rychlost 14 000 při teplotě 21 °C
- 8) poté jsem do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetovala vodní fázi
- 9) přidala 2/3 objemu isopropanolu a 2-3x lehce promíchala
- 10) dala na 24h do -20 °C
- 11) poté znovu centrifugovala 5 minut při 4 °C a rychlosti 14 000, dále odstranila supernatant
- 12) přidala 1000 µl ledového 70 % ethanolu, centrifugovala 5 minut při rychlosti 14 000 a teplotě 4 °C, poté slila a usušila
- 13) dle množství peletu přidala 20-200 µl pufru
- 14) uzavřené mikrocentrifugační zkumavky jsem nechala při 37 °C třepat, aby došlo k rozpuštění DNA po dobu 40 minut, DNA uchovala při -20 °C

4.2 Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace DNA v izolátu jsem použila přístroj Spektrofotometr for Life Science BioSpec – nano od firmy Shimadzu Biotech (Obr. 6).

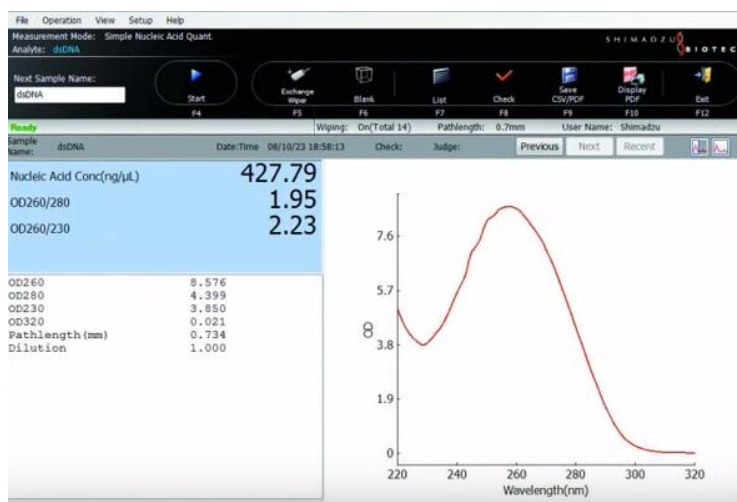
Postup měření:

1) Nejprve jsem vynulovala spektrofotometr oproti slepému vzorku („blank“), kterým je obvykle voda (v našem případě TE pufr), která byla použita pro ředění roztoku

2) Poté jsem napipetovala vždy 1 μ l od každého vzorku DNA a změřila koncentraci DNA, po každém vzorku využijeme automatické otření



Obrázek 6: Spektrofotometr (Shimadzu.com, 2012)



Obrázek 7: Měření koncentrace DNA (Shimadzu.com, 2012), Vpravo je graf, kdy na ose X je vlnová délka v nanometrech a na ose Y číslo OD. Vlevo je vypsána koncentrace nukleové kyseliny. Pod ním je číslo OD 260/280, značící podíl absorbance při 260 nm a 280 nm a hodnotící čistotu izolátu. Optimálně by se měl pohybovat okolo 2, pokud je poměr nižší než 1,8 může to znamenat přítomnost bílkovin nebo jiných kontaminantů. Číslo OD 260/230 se používá jako sekundární míra čistoty, měla by se pohybovat v rozmezí 2,0 – 2,2. Pokud je výrazně nižší může to předpovídat přítomnost kontaminantů.

4.3 Návrh primerů

Existuje řada webových programů pro návrh specifické sekvence primerů, jako jsou např. Primer 3 Input nebo Primer Express. Pro design primerů platí několik obecných pravidel:

- Délka primerů by měla být 18-25 nukleotidů
- Obsah guaninu a cytosinu by se měla pohybovat v rozmezí 40-60 %
- Mělo by být zajištěno rovnoměrné rozmístění oblastí bohatých na G/C a A/T
- Teplota tání by měla být okolo 55-75 °C, T_m primerů by se neměly výrazně lišit, rozdíl mezi T_m primerů maximálně 2 °C

Postup navrhování:

1) Prvním krokem při návrhu primerů je nalezení sekvence daného genu. Nejdříve si tedy na webových stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> vyhledáme sekvenci genu, jež chceme zkoumat.

2) Následuje převod sekvence do **FASTA formátu**, buďto kliknutím na FASTA formát, již v GenBank, nebo zkopírováním sekvence do poznámkového bloku.

3) Pro vlastní návrh primerů, zjištění počátku a konce v sekvenci, teploty tání, podílu GC párů a informací o tvorbě sekundárních struktur a dimerů použijeme program **Primer Express** nebo **Primer 3 Input**, který nalezneme na webových stránkách <http://primer3.ut.ee/>

4) Dále sekvenci zkopírujeme a vložíme do nástroje **Primer BLAST** na webových stránkách <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Díky tomuto programu můžeme zjistit, do jaké míry budou primery nasedat na další sekvence v databázi. Tím můžeme posoudit specifitu primeru. Umožňuje tedy srovnání naší sekvence se sekvencemi v databázi a zároveň rozpoznání obdobných sekvencí nad definovanou hranicí podobnosti, nebo použijeme Clustal na webových stránkách <http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>

5) **Vector** - Tímto programem získáme informace o tvorbě sekundárních struktur a dimerů, Sekundární struktury: tolerance ΔG -5 kcal/mol až 2 kcal/mol

4.4 Polymerázová řetězová reakce

Chemikálie pro PCR:

Termostabilní DNA polymeráza

Směs nukleotidů dNTPs

10x koncentrovaný pufr

MgCl₂

Primer Forward, Primer Reverse

Postup PCR reakce:

PCR reakci jsme provedla v objemu 10 µl za použití komerčního mixu PPP master mix.

Složení reakční směsi (pro 1 vzorek):

5 µl PPP master mix

0,5 µl DNA

0,25 µl Primer 1

0,25 µl Primer 2

4 µl H₂O

Amplifikace byla prováděná v termocyklerech s následujícím teplotním schématem:

Počáteční denaturační fáze	94 °C 5 min
Annealing	57 °C 30 s
Závěrečná elongace	10 min
Chlazení	4 °C

Gradientová PCR

95 °C - 5 min

95 °C - 30 s

52 - 62 °C - 45 s

72 °C – 90 s

72 °C – 10 min

4 °C - ∞

4.5 Příprava agarózového gelu

Agarózový gel byl připraven dle běžné metodiky v závislosti na délce vizualizovaných fragmentů (Tab. 5,6).

Tabulka 5: Složení 1% agarózového gelu

Objem	Agaróza	5 x 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

Tabulka 6: Složení 1,5% agarózového gelu

Objem	Agaróza	5 x TBE	Voda	Ethidium bromid
50 ml	0,75 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,5 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	3,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

Potřeby: zdroj elektrického napětí, elektroforetická vana, vanička, hřebínek, agaróza, elektroforetický pufr TBE, velikostní marker (tzv. ladder).

Postup:

- 1) Na analytických vahách jsem odvážila přesné množství agarózy dle požadované velikosti a koncentrace gelu a vsypala do Erlenmeyerovy baňky
- 2) Dále jsem přidala do baňky přesné množství 1x TBE pufru a krouživým pohybem obsah baňky zamíchala

- 3) Poté jsem vložila baňku do mikrovlnné trouby a zahřívala, dokud směs nebyla kompletně tekutá a transparentní (bez kousků agarózy)
- 4) Připravila jsem formu na gel s hřebínkem
- 5) Zchladila jsem opatrně Erlenmeyerovu baňku i s obsahem pod tekoucí vodou, aby se neroztavila plastová forma a nedošlo k degradaci fluorescenčního barviva
- 6) Přidala jsem do baňky s agarózou požadované množství Ethidium bromidu a dobře zamíchala
- 7) Opatrně jsem vliila obsah baňky do formy na gel s vloženým hřebínkem
- 8) Jakmile gel ztuhl (po 15-20 minutách), vytáhla jsem opatrně hřeben a gel vložila do elektroforetické vany elektroforézy. Přidala jsem 1x TBE pufr do elektroforézy (gel musí být celý ponořen).

4.6 Elektroforéza

Elektroforetické rozdělení DNA fragmentů bylo prováděno v elektroforetické vaně s 1x TBE pufrem (Tris, kyselina boritá, 0,5 M EDTA). Vzorek po PCR amplifikaci byl nanášen do 1% agarového gelu (100 ml TBE, 1 g agarózy a 2 μ l 1 % ethidiumbromidu) nebo 1,5 % agarového gelu s ethidiumbromidem (100 ml TBE, 1,5 g agarózy a 2 μ l 1 % ethidiumbromidu). Jako marker byl použit 100 bp DNA ladder. Na elektroforéze byl prvních 10 minut nastaven proud 40 V, poté zvýšen na 90 V. Celá separace probíhala obvykle kolem 90 minut. Pro vizualizaci rozdělených DNA fragmentů byla využita vlastnost ethidium bromidu navázaného na DNA vyzařovat fluorescenci UV světla. Výsledný gel byl ozářen UV světlem a vyfocen. Tyto snímky byly poté přeneseny do počítače, kde byly softwarově upraveny a vyhodnoceny.

4.7 Primery

Návrh primerů jsem prováděla pro gen **AT3G22470.1** - *Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein* (Obr. 8) a také pro **AT1G12300.1** - *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein* (Obr. 9), které byly na pracovišti University of York v laboratoři prof. I. Bancrofta vytipovány jako geny potenciálně spojené s obnovou fertility v systému Shaan 2A.

```
ATGTTGTGTCGGAGATTGGTACTCGAGCCTCGTATCCCTCCTTACAACCTCATAATTTGCTCTCTTGTTCCTTCTCTC
ATGCGAACGAGGCTTCTCTGGCGATGGGAAGATGTCTTGTACAAAGAGAAGCTGAGGAACGGACTCATCAATATCAAGA
AAGATGAAGCTGTTGCTCTGTTTCAGTCCATGCTTCGGTCTCGTCTCTTCCCTACTCTCATAGATTTTCAGTAACTGTTT
AGTGGCATTGGCCAGAACAAAACAGTATGATCTCGTGTATCTCTGCAACCAAATGGAATTGCAAGGGATTCCACATA
ACATCTACACTCTGAGTATTGTCAATGCTTCTGCAAGGAGTCTGAACTCGGTTTTGCTTTTCAACTTTGATTAAC
GGTTTATGCTCTGTTGGTAGAGTTTCCCAAGCTGTGGAGTTAGTTGATCGTATGGTGGAAATGAAGGTTATTCCAAATCT
CATCACTCTTGTCAATGGACTTTGCTCTCAAGATAGAGTGTCTGAAGCAGTGGCTTTGATAGATCGAATGGTAAAAACG
GATGTCAACCTGACGCATTTACATATGGTCCGATTTTGAACAGAAGCAGTGGCTTTGATAGATCGAATGGTAAAAACG
GATGTCAACCTGACGCATTTACATATGGTCCGATTTTGAACAGAATGTCAAGTCAAGGAGATGGAAGATAGAAAGGTCA
AGCCTCAAGTAGTCACTACAATATCATCATTGACAGTCTTTGCAAGACGGGAGCCTCGACGATGCACTAGCCTTTTTC
AATCAAATGGAAACCAAAGGTATCAAACCAAATGCTTTACCTACACCTCTCTCATTGGAGGCTTTTGTAGTCCGGTAG
ATGGGATGACGGCCACAGTTGTTGAGGATATGATTACAAGGAAATCACACCGGTGTGCGTTGATGATAGTCTTGTG
AAAGAGGGCAAGTTTTCTGAGGCTAAGGAATTGCAATGAGATGATCACAAGAGGCATAGATCTGACACCATACATA
TAATCTTTGATATATGGGTTGTGATGGAGAACCCTTAGATGAGCCCAACCAGATGATGAATCTGATGGTTAGCAAGG
GTTGTGATCCGAGTATCGTACTTATAATACCTTATAAATGGATATTGTAAGGCTAAAATGGTTGATGATGCTACGAGA
CTTTTCCGCAAAATGCTCCGAGAGGAGTGGTTGCGGATTCAGTCACTTATAACACTCTCATCCAAGGGTTTTGTCAATC
TGGCAACTTAATGTGGCAAGGAAGCTTTCCAAGAGATGGTTTCTGAAGGTTTTCATCTAATATTATGACTTACGGTA
TTTTGCTGGATGCGTTGTGACAATGGAGAACTAGAAGAGGCTTTGGGAATACTTGAAGAAATGCAACAAGACTAACATG
GAACCTGACATTTGGTGTCTATAATATCATCATTACGGGATGCAATGCACATAAAGTCTGATGATGCTTGGGATCTATT
CTGTAGCCTCTCTCTCAAAGGAGTGAAGCCTGATGTTAAGACATACACATAATGATGGAGGACTATGTAAGAAAGGCT
CGATGCTGAAGCGGGCCTGTTGTTAAGAAAAATGGGAGAGGATGGGATTCACACAGATGATTGTACGTACAAACACATA
ATCCGAGCACATCTCCGAGGTGGTACGTAGCGACATCAGCTAACTTATAGAAGAAATGAAGAGTTGTGGGTTCTCTTC
AGATGCTTCCACCGTAAAGATTGTTATGGATATGCTATCGGATGGTAGAATGAAGAAAAGCTTTCTGGATATGCTTTCT
AG
```

Obrázek 8: Sekvence genu AT3G22470.1 - *Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein*

```
ATGATGATACGAAGAATGATTCCTCTTCATCGGAAAGCTTTCGATTGGTTACGCTCGTTTTCTCTGGAACAGGTAC
CTCGATTGGTTCTAGCAGCGATAGAAAATTTCTCTTACAAGAGAAACTGAGGAGTGGTCTCGTATATAAAGAAAGATG
ATGCTGTTGCTCTGTTTCAGTCCATGATTCAGTCTCGTCTCTGCTACCGCTCGTTGATTTTCAGTAGATTGTTTGTGGC
ATTGGCCAGAACAAAACAGTATGATCTCGTGTGCTCTCTGCAAGCAAATGGAATCGAATGGGATTGCGCATGACCTCTA
CAGCCTCAGCATTTGTCATCAATTTGCTTCCGCTCGCCGGAAACTCGGTTTTGCTTTTTTGTGTTTTTGGAAAGATGTTGA
AGCTTGGGTATGAGCTACACCGTTACATTTTCAACTTTGATCAACGGATTGTGCTCTGAGGGTTCGAGTCTCTGAAGCT
GTGGAGTTAGTTGATCGTATGGTGGAAATGAAGGTTGTTCCAATCTCATCATACTTAACTCTTGTCAACGGTCTTTG
TCTTCAAGATAGAGTGTCTGAAGCAGTGGCTTTGATAGATCGAATGATGCAACCGATCAATTTTACCTATGTTCCGGTT
TTGAACAGAATGTGAAGTCAAGTAACTGCTCGGCTCGGCTTTGATCTGCTCACAAGATGGAAGATAGAAAAGATCAAGCC
TCAAGTAGTCATATAATATGATCATTGACAGTCTTTGCAAGATGAGAGCTCGACGATGCACTAGCCTTTTTCAGTG
AAATGGAACCAAAGGTATCAAACCAAATGCTTTACCTACACCTCTCTCATAGGAGGCTTCTGTAATGCCGGGAGATGG
GATGACGGCCACAGTTGCTGAGAGATATGATCACAAGGGACATCACCCGGACGTCGTCATTTCAATGCGTTGATTGA
TAGTTTTGTAAAAGAGGGAAAGCTTACGGAGGCTCAAGAATTGACAATGAGATGATCACAAGAGGATAGATCCATAATA
CCATTACATACTACTTTGATATATGGGTTGTGATGGAGAACCCTTAGATGAAGCAACCAGATGATGGACCTGATG
GTTAGCAAGGGATGCGATCCTAATAGCGTGACTTATAGTATCCTTATAAACGGATATTGTAATAAATAACTGGTTGATGA
AGGATGAGACTTTTCCGCAAAATGCTCTGAGAGGAGTGGTTGCGGATACAGTCACTTATAGCACTCTCATCAAGGAT
TTTGTCAAACGGGAAAGCTTAAAGTTGCAAAAGATCTCTTCAAGAGATGGTTTTCTATTGGTGTGCCACCGAGTGTGTG
ACTTACGGTATTTTGTGGATGGGTTGTGACAATGGAGAACTAGAAGGCTTTGGAAATCTTGTATCAATGCAACAA
TTGTAAGATGGATCCTGTTATTTGATATATTCTATAATCATTACGGGATGTCAATGCTGGTAAGGTCGATGGTGTGCT
GGGATCTATTCTGATGCTTACTTCCAAAGGAGTGAAGCCAAATGTTAAGACATTACCGTAATGATTTCCGGATTGTGT
AAGAAAGGTCCTGCTGAAGCAAACTCTTGTCAAGAAAAATGGAGGAAGATGGGATTTGTCCAAATGTTGTACATA
CAACACACTAATCCGAGCTCATCTCAGCGGGTACATAAAGCAACTCAGTTGAACCTCATCGAAGAAATGAAGAGGTGTG
GCTTCTCTGACAGATGCTTCCACATAAAGATGGTATGGATATGTTGTGCGGATGGTAGATTGGACAAAAGCTTTTGGAT
ATGCTCTCTGGTCTTTTGGAGACAATCATCATCATCTGTTGGATTGA
```

Obrázek 9: Sekvence genu AT1G12300.1 - *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein*

4.8 Sekvenování

Příprava vzorku pro sekvenování PCR amplikonů

Postup:

- 1) Nejprve jsem přenesla 10 μ l PCR produktu do popsané 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky
- 2) K PCR produktu jsem přidala 2 μ l enzymu ExoSAP z mrazicího boxu
- 3) Poté nechala 15 minut inkubovat při 37 °C
- 4) Znovu nechala 15 minut inkubovat při 80 °C
- 5) Nakonec jsem přidala 5 μ l Forward primeru
- 6) Takto nachystané vzorky jsem odeslala do firmy SEQme pro sekvenační analýzu

5. Výsledky

5.1 Izolace DNA z děložních listů rostlin s určeným fenotypem

Byla provedena izolace DNA pomocí metody CTAB-PVP. Izolace byla úspěšná u všech vzorků. Koncentrace DNA jsou uvedeny v tab. 7.

Tabulka 7: Koncentrace DNA získané pomocí metody CTAB-PVP

Označení rostliny	Obsah DNA [ng/μl]
Rostlina č. 1	178,54
Rostlina č. 2	84,03
Rostlina č. 3	175,94
Rostlina č. 4	108,22
Rostlina č. 5	98,81
Rostlina č. 6	172,36
Rostlina č. 7	207,43
Rostlina č. 8	249,06
Rostlina č. 9	594,44
Rostlina č. 10	304,73
Rostlina č. 11	451,94
Rostlina č. 12	598,31
Rostlina č. 13	300,88
Rostlina č. 15	112,73
Rostlina č. 16	236,65
Rostlina č. 17	302,56
Rostlina č. 18	84,26
Rostlina č. 19	141,86

5.2 Primery

V tabulce (Tab. 8) je uveden soubor mnou navržených primerů, které byly použity pro amplifikaci částí genů *PPR* a *TPR*. Úspěšně amplifikované úseky byly následně sekvenovány.

Tabulka 8: Seznam testovaných primerů

Název primerů	Sekvence 5'- 3'	Pozice	Tm (°C)	Obsah GC (%)	Počet bází
PPR 1 F	AGC CTC GTA TCC CTC CTC TT	1. pol. genu	59,4	55	20
PPR 1 R	AAT GGT GTC AGG ATC TAT GCC	1. pol. genu	57,5	47,6	21
PPR 2 F	GAG CCT CGT ATC CCT CCT	1. pol. genu	57,07	61,1	18
PPR 2 R	AGG ATC TAT GCC TCT TGT GA	1. pol. genu	55,32	45	20
PPR 3 F	AAG CGG GCC TGT TGT TTA AG	2. pol. genu	56	50	20
PPR 3 R	ACG GTG GAA GCA TCT GAA GA	2. pol. genu	56,2	50	20
PPR 4 F	TTG TAG TGC CGG TAG ATG GG	2. pol. genu	59,17	55	20
PPR 4 R	ACG GTG GAA GCA TCT GAA GA	2. pol. genu	59,02	50	20
PPR 5 F	CGG TCT CGT CCT CTT CCT AC	1. pol. genu	58,98	60	20
PPR 5 R	CTA AGC GGT TCT CCA TGC AC	1. pol. genu	58,99	55	20
PPR 6 F	GAG AAG CTG AGG AAC GGA CT	1. pol. genu	59,11	55	20
PPR 6 R	GCC TCA GAA AAC TTG CCC TC	1. pol. genu	59,12	55	20
PPR 7 F	TCT CTG GCG ATG GGA AGA TG	1. pol. genu	59,24	55	20
PPR 7 R	GTT CTC CAT GCA CAA CCC AT	1. pol. genu	58,45	50	20
TPR 1 F	TCT GCC TAC CGT CGT TGA TT	1. pol. genu	59,11	50	20
TPR 1 R	TGA CTG TAT CGG CAA CCA CT	1. pol. genu	59,03	50	20
TPR 2 F	TTC AGC CTC GTT TCT CTG GA	1. pol. genu	58,66	50	20
TPR 2 R	GTT CTC CAT GCA CAA CCC AT	1. pol. genu	58,45	50	20
TPR 3 F	TCT GTA ATG CCG GGA GAT GG	2. pol. genu	59,24	55	20
TPR 3 R	TCC AAA AGG ACC AGA GAG CA	2. pol. genu	58,57	50	20
TPR 4 F	GAT GGT TTC TAT TGG TGT GCC	2. pol. genu	57,22	47,62	21
TPR 4 R	TGT CCA ATC TAC CAT CCG ACA	2. pol. genu	58,54	47,62	21
TPR 5 F	AGC CTC GTT TCT CTG GAA CA	1. pol. genu	58,95	50	20
TPR 5 R	CTAAGCGGTTCTCCATGCAC	1. pol. genu	58,99	55	20
TPR 6 F	TCT GTA ATG CCG GGA GAT GG	2. pol. genu	59,24	55	20
TPR 6 R	TCC AAA AGG ACC AGA GAG CA	2. pol. genu	58,57	50	20

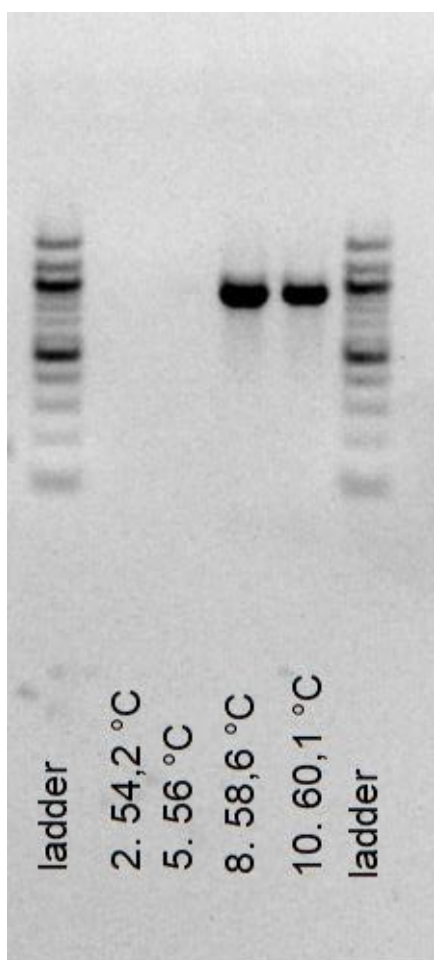
 Primery správně nasedající na DNA => dochází ke specifické amplifikaci

 Primery nesprávně nasedající na DNA => nedochází ke specifické amplifikaci

5.3 Sekvence genu *Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein*

Optimalizace nasedací teploty primerů PPR4 F + R

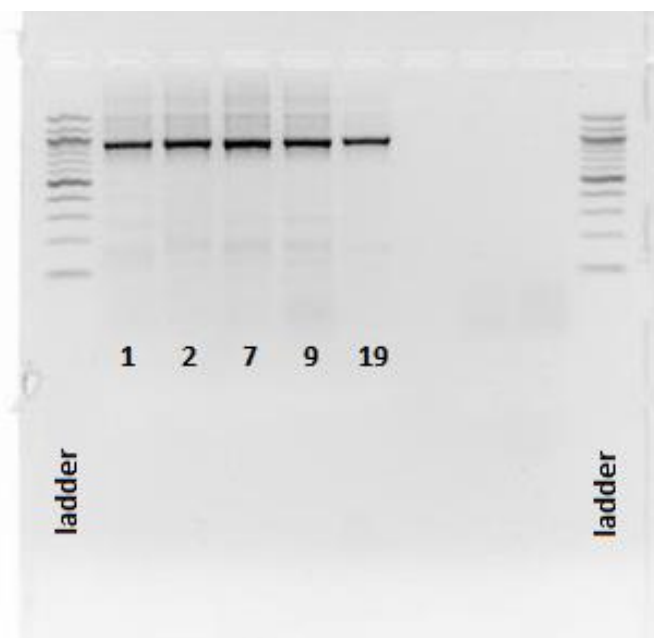
Na obr. 12 jsou výsledky po gradientové PCR, kde se testovala nejvhodnější nasedací teplota nově navržených primerů. Na základě vyhodnocení výsledků gradientové PCR byla jako nejvhodnější teplota vybrána teplota 60,1 °C. Další analýzy byly prováděny s touto teplotou annealingu.



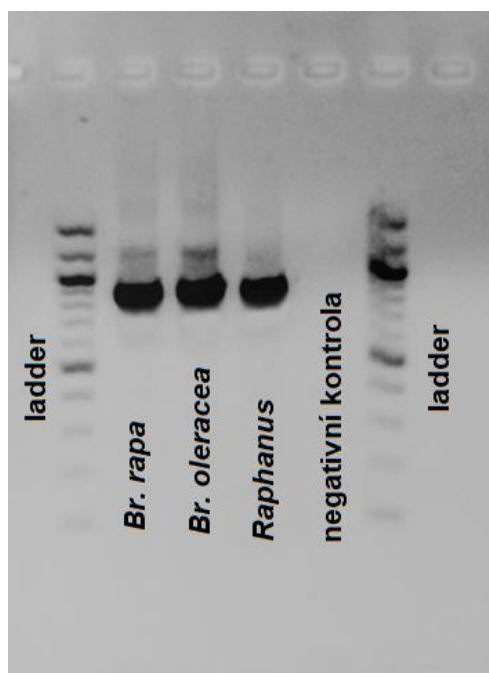
Obrázek 12 Elektroforeogram – Gradientová PCR s primery PPR 4 F + R vzorku DNA rostliny č. 9, Na gel byly naneseny PCR produkty z PCR reakce s nasedacími teplotami 54,2; 56; 58,6 a 60,1 °C, po obou stranách je velikostní marker.

Amplifikace fragmentů DNA a jejich následné sekvenování

Na obr. 13 jsou výsledky po PCR s použitými primery PPR4 F + R pro vzorky DNA rostlin č. 1, 2, 7, 9, 19 a na obr. 14 výsledky po PCR s primery PPR4 F + R pro vzorky DNA rostlin předků řepky.



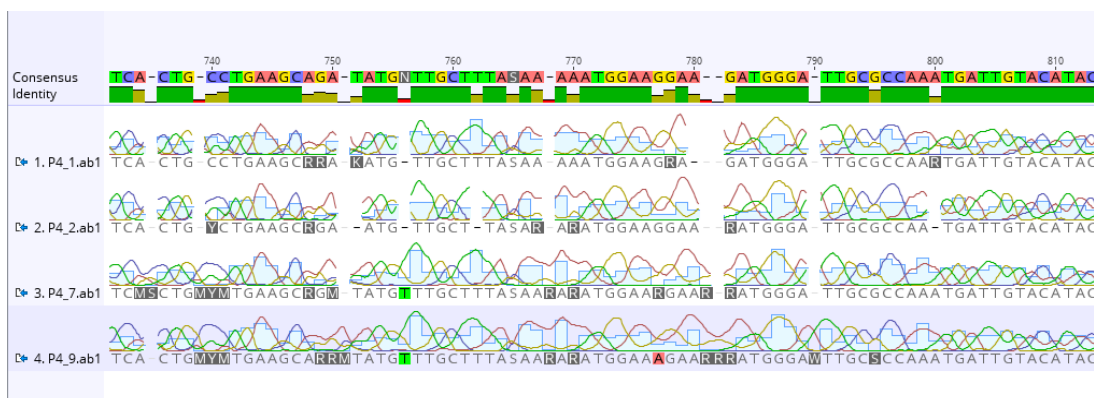
Obrázek 13: Elektroforeogram – PCR s primery PPR4 F + R pro vzorky DNA rostlin č. 1, 2, 7, 9, 19



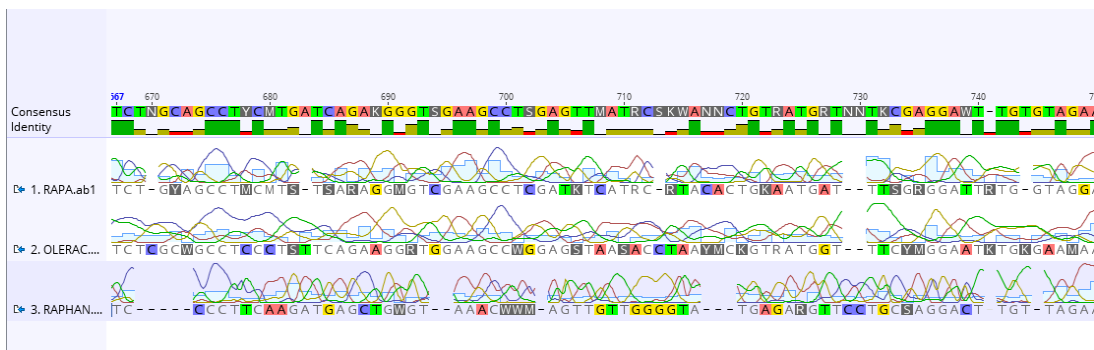
Obrázek 14: Elektroforéza – PCR s primery PPR4 F + R pro vzorky DNA rostlin předků řepky

Sekvenování

Na obr. 15 jsou výsledky po sekvenování, jehož prostřednictvím bylo zjištěno pořadí bází obnovitelů fertility a sterilních matek a na obr. 16 bylo zjištěno pořadí bází předků *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* a *Raphanus* amplifikovaných pomocí primerového páru PPR4 F + R. Následně byly sekvence porovnány v programu Geneious.



Obrázek 15: Porovnání sekvencí obnovitelů fertility (1,2) a sterilních matek (7,9) amplifikovaných pomocí primerového páru PPR4 F + R

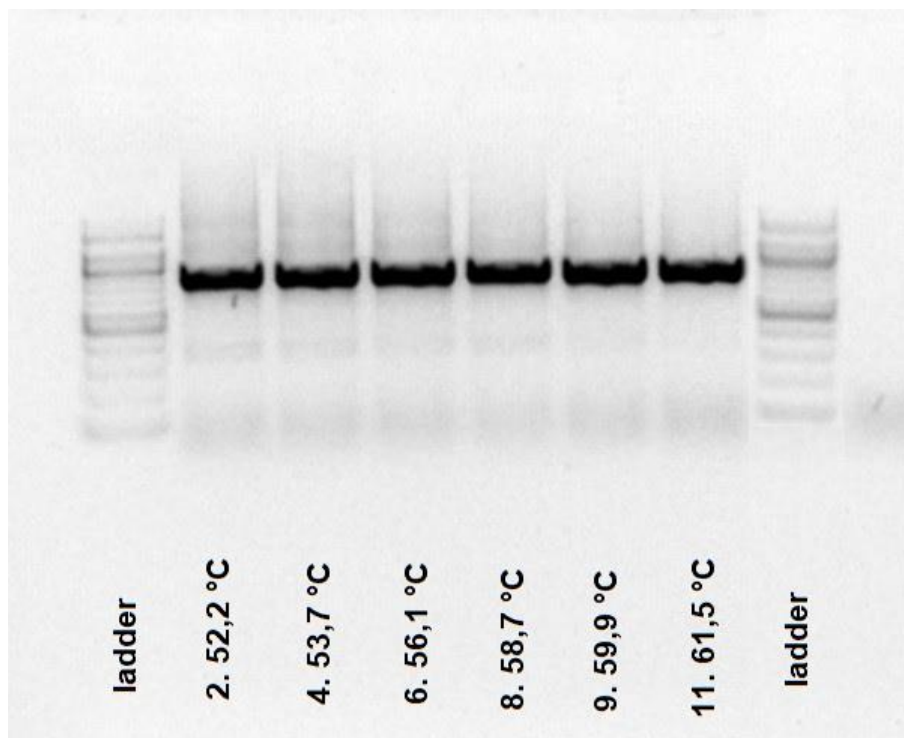


Obrázek 16: Porovnání sekvencí *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* a *Raphanus*

Z důvodu překrývajících se bází nebylo možné zjistit, které báze se mají na pozicích správně nacházet. Proto bylo provedeno sekvenování druhů *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* a *Raphanus* pro zjištění rozdílů mezi předky *Brassica napus* a pro získání vysvětlení překrývajících se bází v předchozím případě. Výsledek sekvenování byl obdobný jako u *Brassica napus*.

Optimalizace nasedací teploty primerů PPR5 F + R

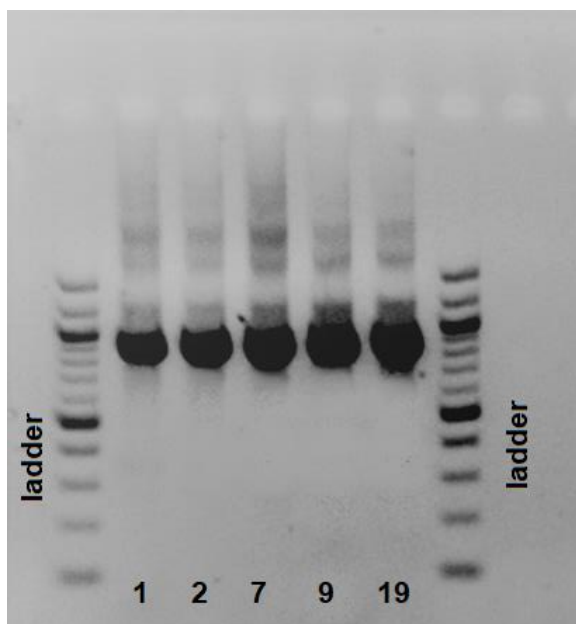
Na obr. 17 jsou výsledky po gradientové PCR, kde se testovala nejvhodnější nasedací teplota nově navržených primerů. Na základě vyhodnocení výsledků gradientové PCR byla jako nejvhodnější teplota vybrána teplota 61 °C. Další analýzy byly prováděny s touto teplotou annealingu.



Obrázek 17: Elektroforéza - Gradientová PCR s primery PPR 5 F + R pro vzorek DNA č. 9. Na gel byly naneseny PCR produkty z PCR reakce s nasedacími teplotami 52,2; 53,7; 56,1; 58,7; 59,9 a 61,5 °C, po obou stranách je velikostní marker.

Amplifikace fragmentů DNA a jejich následné sekvenování

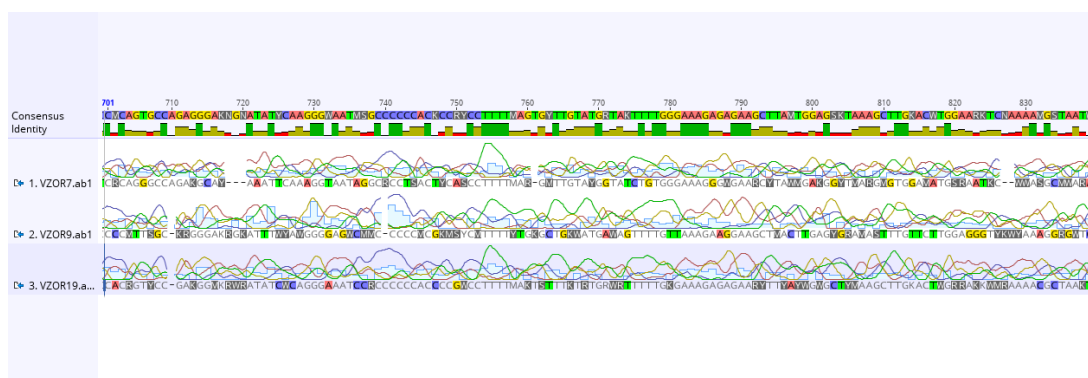
Na obr. 18 jsou výsledky po PCR s použitými primery PPR5 F + R pro vzorky DNA rostlin č. 1, 2, 7, 9, 19.



Obrázek 18: Elektroforeogram – PCR s primery PPR5 F + R pro vzorky DNA rostlin č. 1,2,7,9,19

Sekvenování

Na obr. 19 jsou výsledky po sekvenování, jehož prostřednictvím bylo zjištěno pořadí bází obnovitelů fertility a sterilních matek amplifikovaných pomocí primerového páru PPR5 F + R. Následně byly porovnány v programu Geneious.



Obrázek 19: Porovnání sekvencí obnovitelů fertility (19) a sterilních matek (7,9) amplifikovaných pomocí primerového páru PPR5 F + R

Z důvodu překrývajících se bází nebylo možné zjistit, které báze se mají na pozicích správně nacházet.

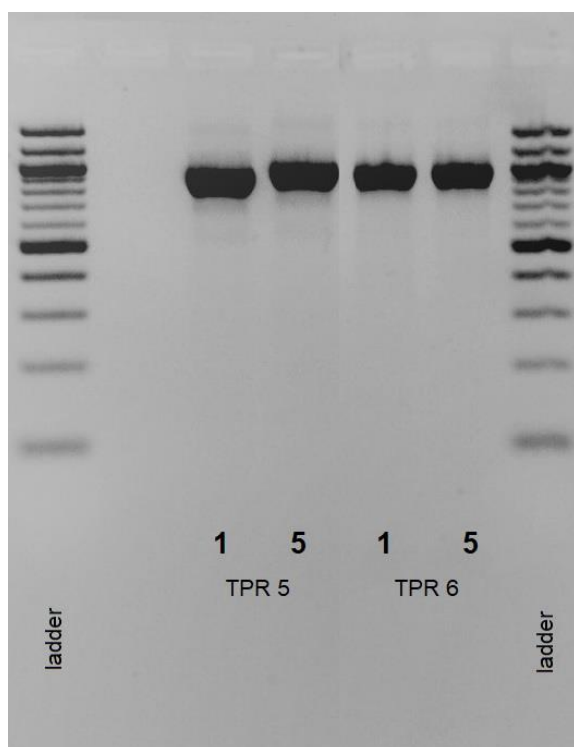
5.4 Sekvence genu *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein*

Optimalizace nasedací teploty primerů TPR5 F + R a TPR6 F + R

Pomocí gradientové PCR byla jako nejvhodnější nasedací teplota pro primerové páry TPR5 F + R a TPR6 F + R stanovena teplota 60 °C.

Amplifikace fragmentů DNA a jejich následné sekvenování

Na obr. 20 jsou výsledky po PCR s použitými primery TPR5 F + R a TPR6 F + R pro obnovitele fertility (1) a sterilní matku (5).



Obrázek 20: Elektroforeogram – PCR – Amplifikace fragmentů genu TPR vzorku č. 1 (obnovitel fertility) a vzorku č. 5 (sterilní matka) s primery TPR5 F + R a s primery TPR6 F + R

5.5 Návrh primerů – markerů pro detekci obnovitele fertility v systému CMS – Shaan 2A

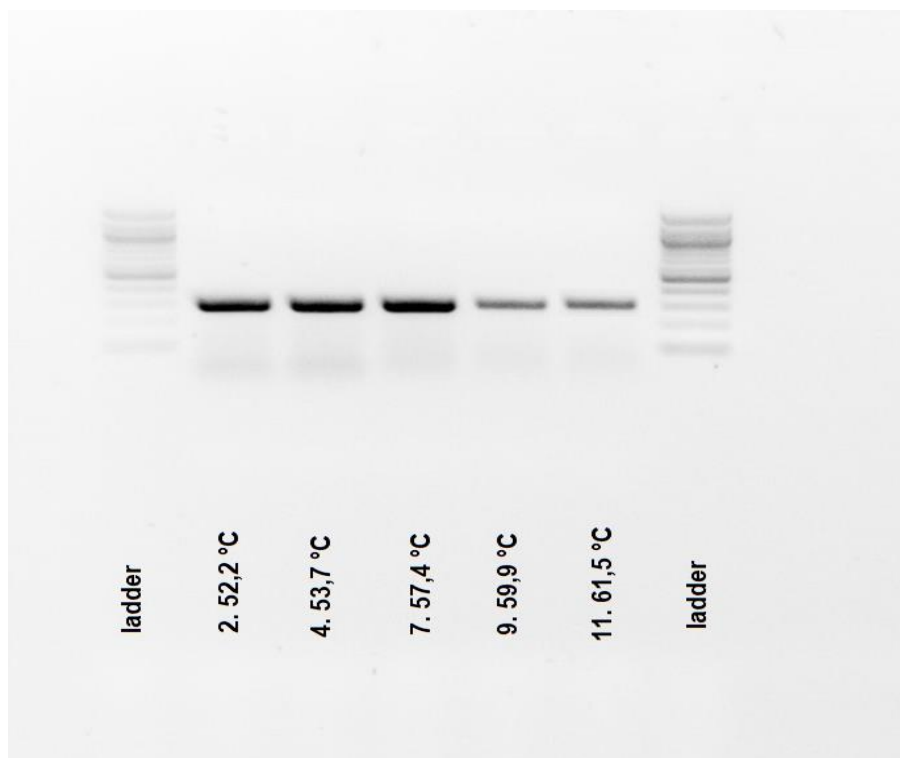
Po porovnání získaných sekvencí jsem zjistila, že obnovitelé fertility a matky mají několik odlišností. Nejvýraznější odlišností je 11 bp dlouhá delece u sterilních matek. U obnovitelů fertility těchto 11 bazí bylo přítomno. Tuto odlišnost jsem použila k návrhu nového selekčního markeru. Seznam mnou navržených specifických primerů pro detekci obnovitele fertility je uveden v tab. 9.

Název primerů	Sekvence 5'- 3'	T _m (°C)	GC (%)	Očekávaná délka fragmentu	Počet bází
S2AcmsF	CCT CTA CAC GCT CAG CAT TGT C	64,0	54,55	300 bp	22
S2AcmsR	GGT AAA TTG ATC GGG TTG ACA TCA TTC	65,3	40,74	300 bp	27
S2ArfF	GCT TGG GTA TGA GCC TAC CAC G	65,9	59,09	200 bp	22
S2ArfR	GGT TGA CAT CCG TTT TCC ATC ATT	61,8	41,67	200 bp	24

Tabulka 9: Seznam navržených specifických primerů pro detekci obnovitele fertility

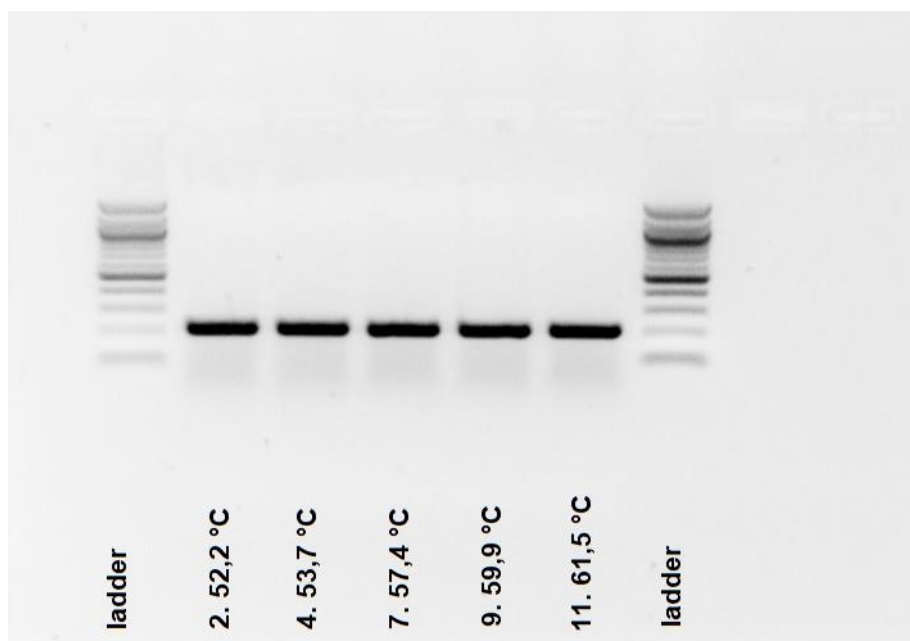
Optimalizace nasedací teploty primerů S2Acms F + R a S2Arf F + R

Na obr. 23 jsou výsledky po gradientové PCR, kde se testovala nejvhodnější nasedací teplota nově navržených primerů S2Acms F + R. Na základě vyhodnocení výsledků gradientové PCR byla jako nejvhodnější teplota vybrána teplota 57 °C. Další analýzy byly prováděny s touto teplotou annealingu.



Obrázek 23: Elektroforeogram – Gradientová PCR s primery S2Acms F + R pro vzorek DNA rostliny č. 5. Na gel byly naneseny PCR produkty z PCR reakce s nasedacími teplotami 52,2; 53,7; 57,4; 59,9 a 61,5 °C, po obou stranách je velikostní marker.

Na obr. 24 jsou výsledky po gradientové PCR, kde se testovala nevhodnější nasedací teplota nově navržených primerů S2Arf F + R. Na základě vyhodnocení výsledků gradientové PCR byla jako nevhodnější teplota vybrána teplota 57 °C. Další analýzy byly prováděny s touto teplotou anealingu

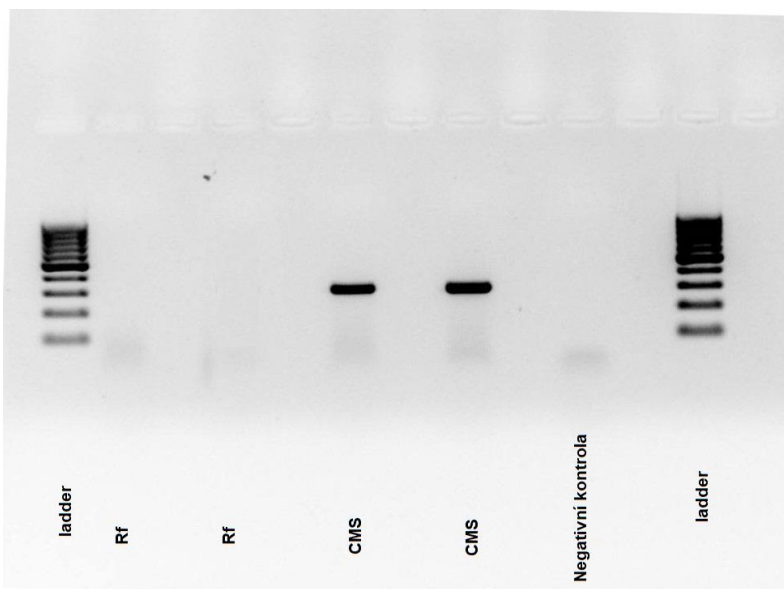


Obrázek 24: Elektroforeogram – Gradientová PCR s primery S2Arf F + R pro vzorek DNA rostliny č. 1

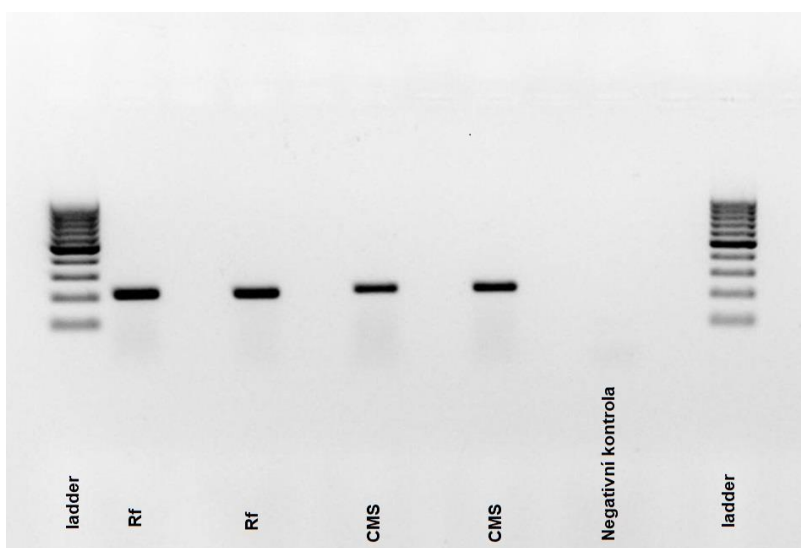
Primerový pár S2Acms F + R specificky amplifikoval fragment DNA, pro který byl navržen. Velikost fragmentů odpovídala předpokladu, nebyly amplifikovány žádné nespecifické fragmenty. Primerový pár S2Arf F + R nespecificky amplifikoval fragment DNA.

Amplifikace fragmentů DNA

Byla provedena PCR pro zjištění schopnosti primerového páru S2Acms F + R detekovat CMS rostliny a páru S2Arf F + R detekovat obnovitele fertility



Obrázek 25: Elektroforeogram - PCR s primery S2Acms F + R pro vzorky DNA rostlin č. 1,2 (rf) a 4,5 (cms)



Obrázek 26: Elektroforeogram - PCR s primery S2Arf F+ R pro vzorky DNA rostlin č. 1,2 (rf) a 4,5 (cms)

Rf – obnovitel fertility

CMS – CMS linie Shaan 2A

Primerový pár S2Acms F + R detekoval CMS rostliny (Obr. 25). Primerový pár S2Arf F + R se musí dále optimalizovat. Bude zapotřebí najít specifičtější primer pro obnovitele fertility (Obr. 26).

6. DISKUZE

V České republice je v hybridním šlechtění řepky olejky používáno několik CMS systémů jako je OguINRA, MSL a Polima. V Číně se vyskytuje 70% odrůd řepky, jež jsou založené na CMS, především na systému Polima nebo Shaan 2A (Zhao et al. 2010). V Evropě však dosud nebyla hybridní odrůda řepky olejky založená na Shaan 2A CMS systému vyšlechtěna žádná. Proto je jedním ze záměrů českých šlechtitelů produkovat nové, vylepšené odrůdy řepky na základě tohoto CMS systému.

V minulosti byly analyzovány sterilní linie Shaan 2A CMS (S; rf/rf), příslušní udržovatelé sterility (N; rf/rf) a obnovitelé fertility (S; Rf/Rf) na molekulární úrovni pro přítomnost funkční CMS cytoplazmy. Byly získány dva primerové páry pokrývající část sekvence mitochondriálního genu spojeného s CMS (orf224-1), jež byla přítomná v Shaan 2A CMS linii a byla úspěšně vyhodnocena selekční schopnost vyvinutých primerů (Havlíčková et al., 2012). Tyto primery jsou používány pro časný výběr rostlin s funkčním Shaan 2A CMS systémem ve šlechtitelských programech. Pro úspěšný výběr rostlin vhodných pro křížení je dále potřeba rozlišit rostliny, které jsou obnoviteli fertility. Problémem zůstává fakt, že jaderný gen odpovědný za obnovu fertility v tomto CMS systému nebyl doposud identifikován. Přesto ale byla optimalizována metodika detekce obnovitelů pomocí molekulárního markeru amplifikujícího oblast DNA, která je s genem pro obnovu fertility ve vazbě (Formanová, 2010). Tato metodika se však po letech využívání zdá být nespolehlivá, neboť dochází k chybám při určování genotypu, které jsou odhaleny po projevení fenotypu. Hlavním cílem této práce tedy bylo najít spolehlivější molekulární marker pro odhalení obnovitelů.

V rámci vzájemné spolupráce se skupinou prof. Iana Bancrofta z University of York byly vytipovány geny, které by mohly být potenciálně zapojené v obnově fertility. Dva z těchto genů jsem se pokusila sekvenovat a následně porovnat jejich sekvence u obnovitelů fertility a u sterilních matek. Navrhla jsem primery ohraničující co největší část sekvence těchto genů a amplifikované fragmenty jsem nechala službou osekvenovat. Očekávala jsem, že u některého z těchto dvou genů by mohla být sekvenční odlišnost mezi obnoviteli a matkami, která by se dala využít pro návrh nového selekčního markeru.

Gen pro *Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein* se nedařilo správně osekvenovat ani při opakovaných pokusech a použití různých kombinací primerů pro amplifikaci fragmentů. Z důvodu překrývajících se bází nebylo možné prokázat

rozdíly mezi rostlinami vytipovanými jako obnovitelé fertility a rostlinami vytipovanými jako sterilní matky a udržovatelé sterility. Zajímavým zjištěním byl výskyt stejných nebo podobných úseků v sekvencích v jednotlivých vzorcích. Pro zjištění důvodů výskytu nespecifických čtení jsem provedla sekvenování těchto fragmentů i u předků řepky (*Brassica rapa*, *Brassica oleracea*) a u dihaploidních linií. I u vzorků DNA těchto rostlin však docházelo k nespecifickým čtením. Podle Barkana a Smalla (2014) se jedná o genovou rodinu zahrnujících více jak 400 členů. Tyto geny si mohou být (a pravděpodobně jsou) sekvenčně velmi podobné, což může být důvodem mých problémů s nespecifitou navrhovaných primerů.

Sekvenci genu pro *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein* se mi podařilo úspěšně sekvenovat a po porovnání získaných sekvencí jsem zjistila, že obnovitelé fertility a matky mají několik odlišností. Nejvýraznější odlišností je 11 bp dlouhá delece u sterilních matek. U obnovitelů fertility těchto 11 bazí bylo přítomno. Tuto odlišnost jsem použila k návrhu nového selekčního markeru. Na navržené primerové páry jsem použila gradientovou PCR. Po jejím provedení jsem zjistila, že oba navržené primerové páry pro detekci obnovitele fertility v systému CMS – Shaan 2A specificky amplifikovaly fragment DNA, pro který byly navrženy a také, že vyšla u obou shodná teplota annealingu. Poté byla provedena PCR pro zjištění schopnosti primerového páru S2Acms F + R detekovat CMS rostliny a páru S2Arf F + R detekovat obnovitele fertility. Primerový pár S2Acms F + R úspěšně detekoval CMS rostliny. Primerový pár S2Arf F + R se musí dále optimalizovat. Bude zapotřebí najít specifičtější primer pro obnovitele fertility. Důvodem neúspěchu je pravděpodobně velice komplikované místo pro nasedání primerů. Bylo tudíž obtížné optimalizovat primerový pár správně. A v neposlední řadě by k optimalizaci bylo potřeba více času, což by bylo nad rámec mé diplomové práce.

PPR a TPR proteiny jsou RNA-vazebné proteiny, které ovlivňují expresi genů v organelách, tedy i v mitochondriích, jak uvádí ve své práci např. Manna (2015). Geny z těchto genových rodin byly dokonce u některých rostlinných druhů identifikovány jako geny pro obnovu fertility (např. u čiroku, jak uvádí Klein et al., 2005). Je tedy určitá naděje, že mnou odhalená 11bp dlouhá delece v genu TPR u sterilních matek může způsobovat posunutí čtecího rámce a vyřadit tak tento gen z funkce. V důsledku toho by nebyla správně modulována exprese některého z mitochondriálních genů, což může mít za následek narušení tvorby pylu. Proto si myslím, že by měla tomuto genu být i nadále věnována pozornost a měla by být dále testována možnost, že právě tento gen stojí za obnovou fertility v CMS systému Shaan 2A.

7. ZÁVĚR

Podle hypotézy na jejímž základě vznikla má diplomová práce, by měly být v oblasti chromozomu, kde se pravděpodobně nachází gen obnovy fertility v CMS systému Shaan 2A i další geny, které jsou vhodnými molekulárními markery pro detekci obnovitele fertility. Na základě sekvenování těchto genů u fenotypově identifikovaných obnovitelů fertility a sterilních matek lze vytipovat sekvence použitelné jako spolehlivý molekulární marker pro rychlou detekci obnovitele fertility u řepky. Cílem práce bylo tuto hypotézu ověřit. Výsledky mnou provedených pokusů potvrzují, že v oblasti, kde se pravděpodobně nachází gen obnovy fertility v CMS systému Shaan 2A jsou i geny vhodné jako molekulární markery pro detekci obnovitele fertility, ale je potřeba další jejich optimalizace.

Byl splněn záměr návrhu primerů ohraničující maximální možnou oblast genů vytipovaných na pracovišti University of York. Dále byla splněna amplifikace těchto oblastí a následná sekvenace službou na komerčním pracovišti, poté alignment získaných sekvencí a vytipování oblastí, které jsou odlišné u obnovitelů fertility a sterilních matek. Nakonec byl proveden návrh nového detekčního systému pro obnovitele fertility v CMS systému Shaan 2A. Úspěšná optimalizace se podařila u primerového páru S2Acms F + R, jež správně detekoval CMS rostliny. U primerového páru S2Arf F + R je potřeba další optimalizace, jež spadá nad rámec mé diplomové práce.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Allender, Charlotte a King, Graham, Origins of the amphidiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear markers, BMC Plant Biology, 2010, 10: 1-9.

Bannerot, H.; Bouldard, L.; Cauderon, Y.; Temp, J., Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*, Eucarpia Meeting *Cruciferae*, Dundee, Scotland, 1974, 52-54.

Baranyk, Petr a Fábry, Andrej, Řepka: pěstování, využití, ekonomika, 1. vydání, Profi Press, Praha, 2007, 208, ISBN: 978-808-6726 267.

Baranyk, Petr; Dostálová, Jana; Kulas, Ladislav; Matějka, Tomáš; Soukup, Josef; Šulák, Milan; Volf, Martin; Brát, Jiří; Kazda, Jan; Macháčková, Ivana; Pechová, Alena; Středa, Tomáš; Toulec, Pavel; Zehnálek, Petr, Olejiny 2017, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad, Brno, 2017, ISBN 978-80-7401-137-5

Barkan, Alice a Small, Ian, Pentatricopeptide repeat proteins in plants, Annual Review of Plant Biology, 2014, 65:415-42.

Bečka, David; Vašák, Jan; Zupalová, Helena; Mikšík, Vlastimil, Řepka ozimá: pěstitelský rádce, Praha, 2007, ISBN: 978-808-7111 055.

Bock, Ralf a Knoop, Volker, Plant mitochondrial mutations, Genomics of Chloroplast and Mitochondria, Springer, 2012, 267–291.

Borges, Aline; Rosa, Mariana Silva; Recchia, Gustavo Henrique; de QueirozSilva, Jurema Rosa; de Andrade Bressan, Eduardo; Veasey, Elizabeth Ann, CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis, Scientia Agricola: Piracicaba, Brazil., 2009, 66: 529-534.

Budar, Françoise a Berthomé, Richard, Cytoplasmic male sterilities and mitochondrial gene mutations in plants. In: Plant mitochondria: Annual plant reviews, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2007, 278–307.

Čurn, Vladislav a Sáková, Lenka, Využití biochemických markerů při hodnocení biodiverzity planých druhů rostlin a řešení taxonomických otázek, Sborník Jihočeské univerzity Zemědělské fakulty v Českých Budějovicích, České Budějovice, 1996, 13: 23 – 35.

- Čurn, Vladislav a Žaludová, Jana, Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars, In: Gupta S. (ed.). Rapeseed Breeding, Advances in Botanical Research, 2007, 45: 155- 179.
- Delourme, Régine a Budar, Françoise, Male Sterility. In: Gómez-Campo, C. (ed.) Biology of *Brassica* coenospecies, Elsevier Science, Amsterdam, 1999, 185–216.
- Dixon, G. R., Origins and diversity of *Brassica* and its relatives. In: Vegetable Brassicas and related crucifers, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 2007.
- Downey, R. K., *Brassica* oilseed breeding: achievements and opportunities, Plant Breeding Abstracts, 1990, 60: 1165-1170, ISSN: 0032-0803.
- Formanová, Nataša; Stollar, Rachel; Geddy, Rachy; Mahé, Laetitia; Laforest, Martin; Landry, Benoit S.; Brown, Gregory G., High-resolution mapping of the *Brassica napus* *Rfp* restorer locus using *Arabidopsis*-derived molecular markers, Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120: 843–851.
- França, Lilian T. C.; Carrilho, Emanuel; a Tarso B. L. Kist, A review of DNA sequencing techniques, Quarterly Reviews of Biophysics, 2002, 35:169-200, ISSN: 0033- 5835.
- Friedt, Wolfgang; Snowdon, Rod; Ordon, Frank; Ahlemeyer, Jutta, Plant Breeding: assesment of Genetic Diversity in Crop Plants and its Exploitation in Breeding, Progress in Botany, 2007,168: 152-177.
- Fu, Tingdong; Yang, Guangsheng; Yang, Xiaoniu, Study and utilization of Polioma cytoplasmic made sterility in *Brassica rapus* L., Crop Research (in Chinese), 1990, 4:9.
- Grelon, M.; Budar, F.; Bonhomme, S.; Pelletier, G., Ogura cytoplasmic male-sterility (CMS)-associated orf138 is translated into a mitochondrial membrane polypeptide in male-sterile Brassica cybrids, Molecular and General Genetics, 1994, 243, 540–547
- Gupta, Surinder Kumar, Wild germplasm and male sterility, Biology and breeding of Crucifers, CRC Press, 2009, 113–127.
- Hanson, Maureen a Bentolila, Stéphane, Interaction of mitochondria and nuclear genes that affect male gametophyte development, The Plant Cell, 2004, 16: 154-169.

Havlíčková, Lenka; Čurn, Vladislav; Jozová, Eva; Kučera, Vratislav; Vyvadilová, Miroslava; Klíma, Miroslav, Sequence Analysis of the mtDNA Region Correlated with Shaan 2A Cytoplasmic Male Sterility in Rapeseed (*Brassica napus* L.), Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2012, 48: 139–142.

Hejný, Slavomil a Slavík, Bohumil, Květena České republiky 3, 2003, Academia, Praha, 542, ISBN: 80-2001090-4.

Horáček, Jiří, Optimalizovaná metodika markerování genu obnovy fertility u řepky ozimé (*Brassica napus* L.), Šumperk, Agritec Plant Researc, Agritec, 2008, ISBN: 978-80-903868-4-6.

Chase, Christine, Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial – nuclear interactions, Trends in Genetics, Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice, 2006, 23:2.

Chloupek, Oldřich, Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, Academia, Praha, Vydání 3., Praha: Academia, 2008, ISBN 978-80-200-1566-2.

Jarvie, Thomas, Next generation sequencing technologies, Drug Discovery Today: Technologies, 2005, 2: 255-260.

Klein, R. R., Klein, P. E., Mullet, J. E., Minx, P., Rooney, W. L., Schertz, K. F., Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12, Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111: 994-1012.

Kubát, Karel, Klíč ke květeně České republiky, 2002, Praha: Academia, 2002, 273, ISBN: 80-200-0836-5.

Kučera, V.; Vyvadilová, M.; Klíma M.: Utilization of cytoplasmic male sterility Shaan 2A in a hybrid breeding of winter oilseed rape, Agricultura Tropica et Subtropica, 2010, 43: 182–185.

Li, Dianrong, Symposium of rapeseed hybrid cultivar Qinyou, Beijing: Chinese Agriculture Press, 1993.

Liu, Gongshe; Zhao, Hong; Liu, Jie, Technique of molecular marker and its application in studies of Brassica plant, Chinese Bulletin of Botany, 1998, 15: 67

Manna, Sam, An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their Applications, Department of Microbiology, Australia, Biochimie, 2015, 113:93-99.

Morinaga, T., Interspecific hybridization in Brassica I., The cytology of F1 hybrids of *B.napella* and various other species with 10 chromozomes, 1929a, Cytologia 1: 16-27, ISSN: 1348-7019.

Morinaga, T., Interspecific hybridization in Brassica II. The cytology of F1 hybrids of *B. cernua* and various other species with 10 chromosomes, Japanese Journal of Botany, 1929b, 4: 277-289.

Morinaga, T., Interspecific hybridization in Brassica III. The cytology of F1 hybrids *B. cernua* and *B. napella*, The Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University, 1929c, 2: 199-206,

Murray, MG. a Thompson, WF., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acids Research, 1980, 19: 4321 - 4326.

Ogura, Hiroshi, Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1968, 6: 39–78, ISSN: 04530853.

O'Neill, Rob; Snowdon, Rod; Köhler, Wolfgang, Population genetic aspects of biodiversity, Progress in Botany, 2003, 64: 115-137

Paterson, Andrew, H.; Lan, Tien-hung, Amasino, Richard; Osborn, Thomas, C.; Quiros, Carlos, *Brassica* genomics: a complement to, and early beneficiary of, the *Arabidopsis* sequence, Genome Biology, 2001, 2: 1011.1-1011.4.

Pelletier, George; Primard, C.; Vedel, Fernand; Chétrit, Phillipe; Rémy, René; Rousselle a Renard, Marleen, Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion, Molecular and General Genetics, 1983, 191: 244–250.

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., Baumeister, K., A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, 1987, Science 238, 336-341.

Rao, Ramanatha. a Hodgkin, Toby, Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources, Plant Cell, Tissue and Organ Cultur, 2002, 68: 1-19

Řepková J. a Relichová, J., Genetika rostlin, 2001, ISBN: 80-210-2736-3.

Saiki, K.; Gelfand, DH; Stoffel, S.; Scharf, SJ.; Higuchi, R.; Horn, GT.; Mullis, KB.; Erlich, HA., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 1988, 239:487-491.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74: 5463-5467.

Singh, M., Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region, *The Plant Cell*, 1991, 3:1349.5

Snustad, Peter; Simmons; Michael, Relichová, Jiřina, *Genetika*, Brno: Masarykova univerzita, 2009, ISBN: 978-80-210-4852-2.

Song, Keming a Osborn, Thomas, Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organella and nuclear RFLP analyses, *Genome*, 1992, 35: 992-1101

SPZO, Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2013/2014, Praha: Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, 2001, ISBN: 978-80-87065-45-7.

Šmarda, Jan; Doškař, Jan; Pantůček, Roman; Růžičková, Vladislava; Koptíková, Jana, *Metody molekulární biologie*, 1. vydání, Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188, ISBN 80-210-3841-1.

Tian, Zhihong, Progress of studies on the utilization of male sterility and heterosis in rapeseed, *J. of Hubei Agricultural College (in Chinese)*, 1997, 17(1): 151.

U, Nagaharu, Genomic analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 1935, 7:389-452.

UPOV, General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized description of new varieties, Geneva, 2002.

Vašák, Jan, *Řepka*, Praha: Agrospoj, Semafor, 2000, ISBN: 80-239-4236-0.

Wang, Yongfei.; Ma, Sanmei; Wang, Ming; Zheng, Xueqin; GU Mao; HU Shengwu, Sequence analysis of the gene correlated with cytoplasmic male sterility (CMS) in rape- seed (*Brassica napus*) Polima and Shaan 2A, *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47: 124, ISSN: 1861-9541

Williams, John; Hanafey, Michael; Rafalski, Antoni; Tingey, Scott, Genetics analysis using RAPD markers, *Methods in Enzymology*, 1992, 260: 335 - 348.

Yu, Chengyu; Leišová, Leona; Kučera, Vratislav; Vyvadilová, Miroslava; Ovesná, Jaroslava; Dotlačil, Ladislav; Hu, Shengwu, Assessment of genetic diversity of yellow-seeded rapeseed (*Brassica napus L.*) accessions by AFLP markers, *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2007, 43: 105-112, ISSN: 1805-9325.

Zhao, H. X.; Li, Z. J.; Hu, S. W.; Sun, G. L.; Chang, J. J.; Zhang, Z. H., Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus L.*) accessions by a multiplex PCR assay, *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 121: 623–650.

Zvárová, Jana a Mazura, Ivan, *Metody molekulární biologie a bioinformatiky, Biomedicínská informatika*, 1. vydání, Praha: Karolinum, 2012, ISBN: 978-80-246-2150-0.

INTERNETOVÉ ZDROJE

Český statistický úřad - ČSÚ, 2015, Dostupné z: <https://www.czso.cz/>

Český statistický úřad - ČSÚ, 2017, Dostupné z: <https://www.czso.cz/>

Český statistický úřad - ČSÚ, 2018, Dostupné z: <https://www.czso.cz/>

eAGRI: Ministerstvo zemědělství: Zemědělství, 2005, Praha, Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/ministerstvo-zemedelstvi/vyrocní-a-hodnotící-zpravy/publikace-zemedelstvi/?date=2014-8&root=14976&type=&pos=10>

eAGRI: Ministerstvo zemědělství: Zemědělství, 2006, Praha, Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/ministerstvo-zemedelstvi/vyrocní-a-hodnotící-zpravy/publikace-zemedelstvi/?date=2014-8&root=14976&type=&pos=10>

Estevezj, (CC BY-SA 3.0), Sanger sequencing, 2012, Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2008, Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2017, Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Köhler, F. E., Köhler's Medizinal-Pflanzen, Missouri Botanical Garden, USA, 1897,
Dostupné z: <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/koehler/RAPS.jpg>

Labguide, Klasické metody sekvenování, 2014, Dostupné z:
<http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/>

Shimadzu Corporation, BioSpec–nano Spectrophotometr for Life Science, 2012,
Dostupné z: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/Spectroscopy/c101-e112c.pdf>

United States Department of Agriculture - USDA, Oilseeds: World Markets and Trade, 2017, Dostupné z: <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>

ADM Germany G.m.b.H, Report, 2016, Dostupné z: <https://www.adm.com/adm-worldwide/europe/germany/gmbh>