

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

**TESTOVÁNÍ GENETICKÉ ČISTOTY HYBRIDNÍHO OSIVA ZELÍ
HLÁVKOVÉHO POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH METOD**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

Mgr. Jana Raddová, Ph.D.

Vypracovala

Bc. Denisa O'Shea

Lednice 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů rostlin; programy, modely, využití, vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne 28. 04. 2017

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Janě Raddové, Ph.D., za odborné vedení, za pomoc, za rady a za vstřícnost při konzultacích a při vypracování této práce. Děkuji také kolektivu z laboratoře na Mendeleu za pomoc při práci v laboratoři a doc. Mgr. Miroslavu Baránkovi, Ph.D. za odborné konzultace.

OBSAH:

SEZNAM OBRÁZKŮ	7
SEZNAM TABULEK.....	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1 Zelí hlávkové (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	11
3.1.1 Historie.....	12
3.1.2 Taxonomie	13
3.1.3 Botanický popis.....	13
3.1.4 Genom rodu <i>Brassica</i>	14
3.1.5 Odrůdy	16
3.2 Molekulární metody.....	17
3.2.1 PCR	18
3.2.2 Molekulární metody založené na PCR.....	22
3.2.2.1 RAPD.....	23
3.2.2.2 AFLP.....	24
3.2.2.3 SSR (<i>Simple sequence repeat</i> - opakující se jednoduché sekvence – mikrosatelity)	25
4 MATERIÁL A METODY	33
4.1 Rostlinný materiál.....	33
4.2 Expresní izolace DNA.....	33
4.3 SSR analýza	34
4.3.1 Použité SSR primery testované v této diplomové práci.....	34
4.3.2 Teplotní program termocykleru	35
4.3.3 Vyhodnocení úspěšnosti primerů	36
5 VÝSLEDKY	37
5.1 Stanovení čistoty a kvality DNA.....	37
5.2 Analýza hybridních potomstev	37
5.2.1 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1	38
5.2.2 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1	41
5.2.3 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1	43
5.3 Hodnocení genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového	46
6 DISKUZE.....	47
7 ZÁVĚR	49

8	SOUHRN A RESUME	50
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
10	PŘÍLOHY	58

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1** Variety košťálové zeleniny vzniklé z *Brassica oleracea* L. (Brimeyer, 2016) (str. 11)
- Obr. 2** Množství produkce zelí a ostatních košťálovin v roce 2014 (FAOSTAT, 2017) (str. 12)
- Obr. 3** Perokresba - zelí hlávkobé a brukev (Polívka, 1900) (str. 14)
- Obr. 4** Trojúhelník "U" (Chanin, 2013) (str. 15)
- Obr. 5** Křížení a vznik F1 hybridů, ztráta výjimečných vlastností v F2 generaci (str.17)
- Obr. 6** Princip PCR reakce (BioNinja, 2016) (str. 21)
- Obr. 7** Příklad fragmentů získaných amplifikací SSR lokusu (str. 36)
- Obr. 8** Kontrola kvality a koncentrace DNA na na 0,8% agarózovém gelu (str. 37)
- Obr. 9** Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass25 II - 1. sada (str. 39)
- Obr. 10** Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass25 II - 2. sada (str. 39)
- Obr. 11** Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass32 II - 1. sada (str. 40)
- Obr. 12** Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass32 II - 2. sada (str. 40)
- Obr. 13** Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass29 II - 1. sada (str. 41)
- Obr. 14** Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass29 II - 2. sada (str. 42)
- Obr. 15** Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass30 II - 1. sada (str. 42)
- Obr. 16** Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass30 II - 2. sada (str. 43)
- Obr. 17** Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass25 II - 1. sada (str. 44)
- Obr. 18** Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass25 II - 2. sada (str. 44)
- Obr. 19** Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass29 II - 1. sada (str. 45)
- Obr. 20** Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass29 II - 2. sada (str. 45)
- Obr. 21** Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass33 II - 1. sada (str. 46)
- Obr. 22** Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass33 II - 2. sada (str. 46)

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Celková sklizeň zeleniny v ČR (t) - výběr zelenin s nejvyšším výnosem (Buchtová, 2015) (str. 12)

Tab. 2 Odrůdy zelí hlávkovéhoho zapsané ve Státní odrůdové knize (ÚKZÚZ, 2016) (str. 16)

Tab. 3 Seznam sledovaných odrůd (str. 33)

Tab. 4 Chemikálie pro reakční směs PCR (str. 34)

Tab. 5 Použité primery vybrané podle doporučení školitele (str. 35)

Tab. 6 Teplotní program PCR (str. 36)

Tab. 7 Použité primery (+) a vhodné primery (++) (str. 38)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
AT	adenin a thymin
CG	cytosin a guanin
F1 a F2	1. filiální generace a 2. filiální generace
kb	kilobází
MAS	markery asistovaný výběr
pb/bp	páry bazí
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAPD	polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů DNA
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů
RT - PCR	real-time PCR
SSR	opakující se jednoduché sekvence
WGT	triplikace celého genomu

1 ÚVOD

Zelí hlávkové (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) patří do čeledi *Brassicaceae* je jednou z nejvíce pěstovaných zelenin na světě a také jednou z nejstarších pěstovaných rostlin kultivovaných od starověku. Už rané civilizace používaly několik forem "zelí" a ty byly pravděpodobně znovu vybrány pro domestikaci v raném středověku v severozápadní Evropě. Dnes je zelí ekonomicky důležitou plodinou pěstující se ve více než 90 zemích po celém světě

Zelí hlávkové se používá k přímému konzumu, na vaření a zpracování, má významné místo v kultuře a tradiční kuchyni mnoha zemí, dále jako krmivo a je široce používáno v tradiční medicíně. Je známo, že zelí je důležitým zdrojem glukosinolátů, fenolických sloučenin, karotenoidů, a různých vitamínů (Šamec *et al.*, 2016). Vyznačuje se vysokým obsahem minerálních látek (Ca, Mg, P, S) a vysokým obsahem vlákniny. Filozof Aristoteles jedl zelí před pitím alkoholu, aby zabránil vínu "od omámení jeho moudré akademické hlavy" (Šamec *et al.*, 2016). Skrz historii bylo také známé jako "lék pro chudé" a bylo používáno k celkovému zlepšení zdraví a léčení různých zánětů, zažívacích potíží nebo "očistění krve" (Passalacqua *et al.*, 2007).

Některé důkazy naznačují, že moderní odrůdy hlávkového zelí jsou potomky planých divokých nehlávkových brukvovitých rostlin, původně rostoucích na pobřeží východního Středomoří a Baltského moře (Balkaya *et al.*, 2005). V dnešní době se sortiment nabízených odrůd stále více orientuje na hybridní odrůdy poskytující vyšší vyrovnanost hlávek a tím i jejich lepší prodejnost, vyšší výnosy a lepší uchovatelnost. Šlechtění se orientuje především na jednotné dozrávání hlávek ke sklizni, které vyhovuje velkoproducentům, odolnost vůči chorobám, vhodnost ke skladování, ale i na zlepšení nutriční hodnoty a chuťových vlastností.

Předkládaná diplomová práce se zabývá testováním genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového a účinností primerů v rámci hybridních potomstev. Primery byly vybrány dle výsledků skříňku F1 hybridů a jejich rodičovských linií provedeného v rámci výzkumného projektu na pracovišti Mendeleum. Literární část se věnuje zelí hlávkovému a nejdůležitějším molekulárním metodám.

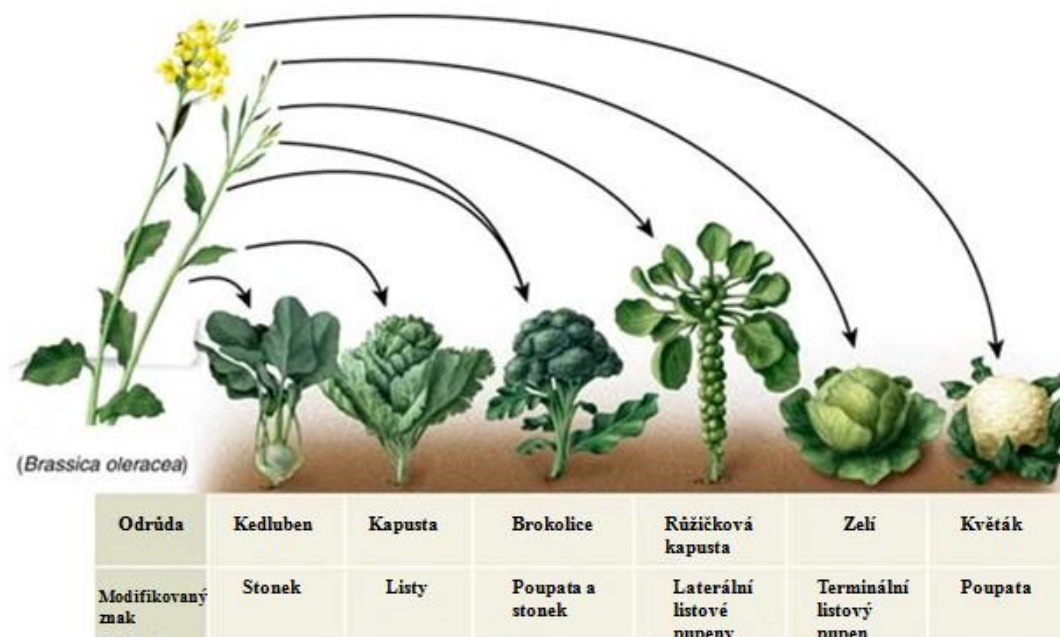
2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo testování genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového pomocí molekulární metody SSR a vyhledání odpovídajících SSR primerů, které by tuto genetickou čistotu prokázaly.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Zelí hlávkové (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

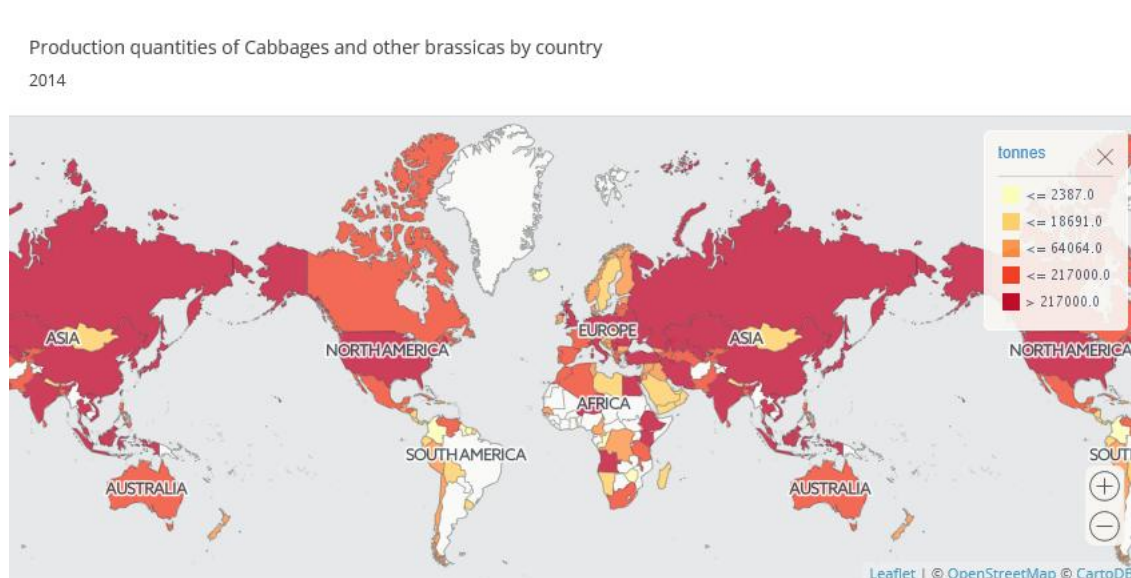
Zelí hlávkové je hlavním představitelem skupiny košťálovin, do které patří dnešní kulturní formy - kapusta hlávková, kapusta růžičková, kedluben, květák, brokolice, kadeřávek a kapusta listová. Obecně se předpokládá, že všech šest pěstovaných skupin pochází z divoké západoevropské brukve zelné (*Brassica oleracea* L.). Proto se mohou vzájemně křížit a tvořit přechodné formy. Nicméně několik autorů prezentovalo různé teorie navrhuující *Brassica montana* Pourr. jako předka pro zelí hlávkové a kapustu, *Brassica rupestris* Raf. pro kedluben a *Brassica cretica* Lam. pro květák a brokolici (Snogerup, 1980).



Obr. 1 Variety košťálové zeleniny vzniklé z *Brassica oleracea* L. (Brimeyer, 2016)

Výše uvedené kulturní formy z čeledi *Brassicaceae* jsou po celém světě široce pěstovány jako brukvovité zeleniny. Převážně zelí hlávkové (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) patří mezi zeleniny světově nejvíce běžně pěstované (www.fao.org). Jako pěstovaná plodina se zelí vyskytuje ve všech světadílech, patří k nejranějším a nejrozšířenějším zeleninám. Je typickou zeleninou mírného pásma, nejvíce pěstovanou právě v Evropě, kde je známé ve všech zemích. V České republice dosahuje hlávkové zelí nejvyšších výnosů z pěstovaných zelenin a roční spotřeba zelí hlávkového (bílého a červeného) činila v roce 2013 8 kg na osobu (Buchtová, 2015). I když je

v našich podmínkách stále oblíbenou zeleninou, lze pozorovat v delším časovém horizontu postupné snižování jeho spotřeby (roční spotřeba v roce 2004 byla 14 kg na osobu), díky trendu menšího zájmu spotřebitelů o druhy zelenin časově náročnějších na úpravu (Petříková a Hlušek 2012).



Obř. 2 Množství produkce zelí a ostatních košťálovin v roce 2014 (FAOSTAT, 2017)

Tab. 1 Celková sklizeň zeleniny v ČR (t) - výběr zelenin s nejvyšším výnosem (Buchťová, 2015)

Zelenina/rok	2013	2014
Zelí hlávkové	46 256	60 056
Cibule	40 309	46 238
Mrkev	31 151	35 831
Rajčata	19 866	24 003
Okurky nakladačky	17 615	23 287

Odrůdy druhu *Brassica oleracea L.* jsou velmi důležité zeleniny pro lidskou a zvířecí spotřebu a představují podstatnou část řady národních diet. Kromě jejich hospodářského významu jsou zeleniny této čeledi považovány za důležité zdroje vitaminů a vlákniny (Lorenz a Maynard, 1988; Rubatzky a Yamaguchi, 1997) a antikarcinogenních sloučenin (Rosa *et al.*, 1997).

3.1.1 Historie

Genetická rozmanitost a pružnost jsou charakteristické rysy všech členů čeledi *Brassicaceae* (dříve *Cruciferae*). Je možné, že tyto vlastnosti podporovaly jejich domestikaci od dob neolitického člověka. Záznamy ukazují, že starověcí Řekové, Římané, Indové a Číňané je značně oceňovali a používali. Aristoteles (384-322 př.nl),

Theophrastus (371-286 př.nl), Cato (234-149 př.nl), Columella (1. století nl) a Plinius (23-79 nl), ti všichni zmínili důležitost košťálovin. Dále na východ, stará sanskrtská literatura Upanishadu a Brahamanu, které pocházejí z období kolem roku 1500 před naším letopočtem, zmiňují košťáloviny, a čínský Shih-t'ing, pravděpodobně upraven Konfuciem (551-479 př.nl), odkazuje na tuřín (Keng, 1974; Prakash a Hinata, 1980). Evropská bylinná a botanická pojednání středověku jasně ilustrují několik typů rodu *Brassica*, a holandské malby z 16. a 17. století znázorňují mnoho příkladů košťálovin (Dixon, 2007).

Rané civilizace používaly několik forem "zelí" a ty byly pravděpodobně znovu kultivovány při domestikaci v raném středověku v severozápadní Evropě jako důležitá součást lidské stravy a lékařství a jako krmivo pro zvířata. Písemné zmínky o zelí se objevují už ve 3. století před naším letopočtem. Podle mnohých, i když neucelených zpráv, znali zelí již staří Řekové a Římané. V antice se používalo jako lék - jako rostlina posilující, zvyšující odolnost vůči vředům a různým epidemiím. V ruské literatuře jsou první zmínky již v 10. století, v Německu ve 12. století. Od 16. století dále rozšířili evropští kolonisté zelí po celém světě. Skandinávští a němečtí migranti rozšířili zelí do Severní Ameriky, zejména do středozápadních států, jako je Wisconsin (Dixon, 2007).

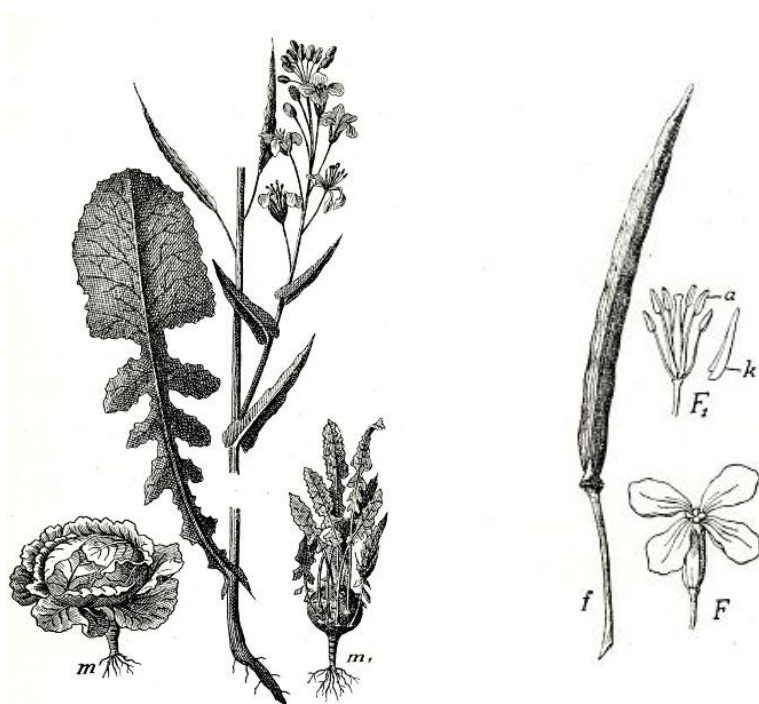
3.1.2 Taxonomie

Taxonomicky se zelí hlávkové řadí do říše rostlin (*Plantae*), podříše cévnatých rostlin (*Tracheobionta*), oddělení krytosemenných (*Magnoliophyta*), třídy vyšších dvouděložných (*Rosopsida*), řádu brukvotvarých (*Brassicales*), čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), rodu brukve (*Brassica*) a druhu brukeve zelné (*Brassica oleracea*).

3.1.3 Botanický popis

Zelí hlávkové je dvouletá rostlina, která se pro své vícevrstvé listové hlávky pěstuje jako jednoletá zelenina. Klíčení je epigeické a sazenice zelí mají tenkou kořenovou soustavu a srdčité dělohy (Dixon, 2007). První pravé listy jsou vejčitého tvaru s laločnatým řapíkem. Počáteční listy tvoří tvar růžice, pak se vyvíjejí nové zelné listy s kratšími řapíky začínající se skládat dovnitř a tvořící hlávku. V prvním roce vytváří zkrácenou zdužnatělou lodyhu, tzv. košťál. Na lodyze jsou v genetické spirále rozmístěny hladké zelené (*forma alba*) nebo červenofialové (*forma rubra*) listy. Vzdálenosti mezi za sebou následujícími listy (internodia) se směrem k vrcholu

zkracují, čímž dochází k přerůstání výše postavených listů listy níže postavenými. Výsledkem tohoto procesu, který se označuje jako epinastie, je tvorba hlávky. Listy v hlávce jsou k sobě těsně přisedlé. Tvar hlávky je velmi variabilní - kulovitý, plochý, kuželovitý s celou řadou přechodných tvarů. Košťál se rozlišuje na vnější (od povrchu půdy po bázi hlávky) a vnitřní (část uvnitř hlávky). Hlávky zelí jsou obvykle v rozmezí od 0,5 do 4 kg (existují ale i odrůdy s hmotností hlávky 10 - 15 kg), a mohou být zelené, světle zelené až bílé nebo červenofialové barvy. Kvetení a produkce semen se obvykle odehrávají ve druhém roce životního cyklu rostliny. U rostlin citlivých na jarovizační teploty může dojít k vykvetení už v prvním roce. Květenství je nerozvětvený terminální hrozen 50 - 100 cm vysoký, se žlutými nebo bílými květy. Každý květ má čtyři okvětní plátky (petaly) a sadu čtyř kolmo postavených kališních lístků (sepalů), šest tyčinek, a dvoupouzdrý semeník s jednoduchou bliznu a čnělku. Dvě ze šesti tyčinek mají kratší nitku. Plodem je šešule, která se při zralosti otvírá a odhaluje hnědá nebo černá, kulatá semena. Rostliny jsou cizosprašné, hmyzosnubné. Z pohledu květní indukce je zelí rostlinou dlouhodobní. Kořenový systémem vzrostlých rostlin je vláknitý a mělký.



Obr. 3 m = zelí hlávkové, m₁ = brukev, f = šešule, F = květ, F₁ = vnitřek květu, k = kalich, a = tyčinky (Polívka, 1900)

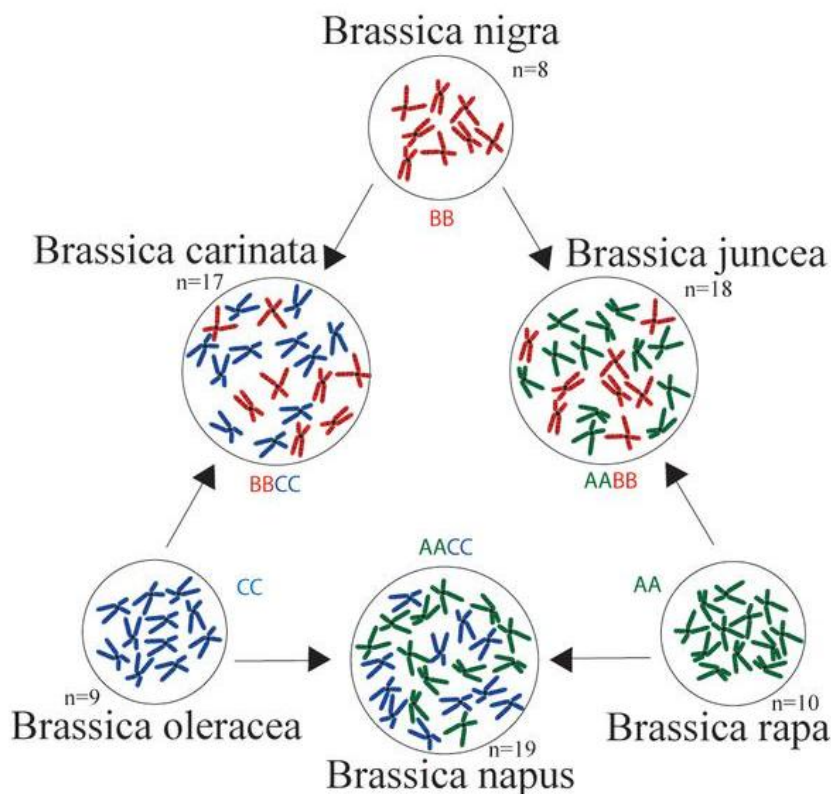
3.1.4 Genom rodu *Brassica*

Rostliny rodu *Brassica* obsahují mnoho různých druhů a každý druh obsahuje bohaté morfotypy vyznačující se extrémními vlastnostmi. Ve srovnání s modelovou

rostlinou *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. prošly navíc druhy rodu *Brassica* triplikací celého genomu (WGT = whole genome triplication). Sekvenování celého genomu druhů *Brassica rapa* L., *Brassica oleracea* L. a dalších, ukázalo, že WGT hraje důležitou roli při speciaci (evoluční proces vzniku nových biologických druhů) a diverzifikaci (rozrůžňování) morfortypu brukvovitých rostlin (Cheng *et al.*, 2014).

Značná genetická diverzita je přítomna u tří amfidiploidních druhů (Song *et al.*, 1996). Amfidiploid je mezidruhový hybrid s diploidní sadou chromozomů od každého rodiče. Na základě studií genetické diverzity může být *Brassica napus* L. považována za nejstaršího amfidiploida, následovaného *Brassica juncea* (L.) Czern. a *Brassica carinata* A. Braun. Za obecnou diverzitu v rámci amfidiploidů jsou zodpovědné dva hlavní faktory: četná křížení s různými diploidními rodiči a modifikace genomu následující polyploidizací.

Trojúhelník "U" demonstruje vývoj a vztahy mezi členy rodu *Brassica*. Ukazuje, jak se genomy tří rodových druhů *Brassica* spojily a vytvořily tři druhy dnešních běžných zelenin a plodín s olejnatými semeny. Trojúhelník byl pojmenován po Nagaharu U, korejském botanikovi, který publikoval teorii v roce 1935 jako součást jeho studií brukvovitých druhů.



Obr. 4 Trojúhelník "U" (Chanin, 2013)

Rod *Brassica* zahrnuje tři druhy diploidní (*Brassica rapa* L., n = 10, AA; *Brassica nigra* (L.) W. D. J. Koch, n = 8, BB; a *Brassica oleracea* L., n = 9, CC), a další tři druhy amfidiploidní, odvozené z každého páru tří diploidních druhů (*Brassica juncea* (L.) Czern, n = 18, AABB; *Brassica napus* L., n = 19, AACC; *Brassica carinata* A. Braun, n = 17, BBCC). Genomy rodu *Brassica* se značí písmeny A, B, a C a jsou odvozeny od allohexaploidního předka (Röbbelen, 1960). Genetické vztahy těchto druhů byly určeny a potvrzeny pomocí rozsáhlých experimentálních křížení mezi tetraploidními a/nebo diploidními rostlinami, stejně jako pomocí karyotypingu nebo mikroskopické kontroly u těchto křížení (U, 1935).

3.1.5 Odrůdy

Ve Státní odrůdové knize je ke dni 15.6.2016 zapsáno 41 odrůd pro zelí hlávkové bílé (z toho 32 odrůd hybridních) a 9 odrůd pro zelí hlávkové červené (z toho 4 hybridní odrůdy) viz Tab. 2.

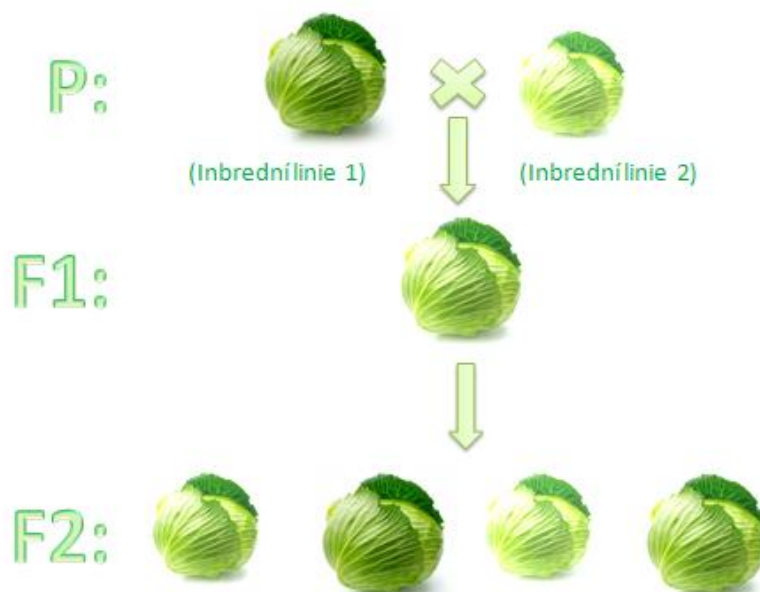
Tab. 2 Odrůdy zelí hlávkového zapsané ve Státní odrůdové knize (ÚKZÚZ, 2016)

Zelí hlávkové bílé:	14. 'Holt'	28. 'Polar'	Zelí hlávkové červené:
1. 'Albatros F1'	15. 'Hornet F1'	29. 'Portoza F1'	
2. 'Aros F1'	16. 'Inter'	30. 'Pourovo polopozdní'	1. 'Kalibos'
3. 'Atila F1'	17. 'Juna F1'	31. 'Pourovo pozdní'	2. 'Koda'
4. 'Autmn Prince F1'	18. 'Kalibro F1'	32. 'Pylon F1'	3. 'Kvit F1'
5. 'Avak F1'	19. 'Kiklop F1'	33. 'Ritmo F1'	4. 'Mars'
6. 'Betti F1'	20. 'Korino F1'	34. 'Sláva F1'	5. 'Moderat F1'
7. 'Dawn F1'	21. 'Lark F1'	35. 'Sonja F1'	6. 'Mohykan F1'
8. 'De Bazäu'	22. 'Lena F1'	36. 'Status F1'	7. 'Pourovo červené'
9. 'Diamant F1'	23. 'Libreto F1'	37. 'Target F1'	
10. 'Dita'	24. 'Madison F1'	38. 'Trvalo F1'	8. 'Red Dynasty F1'
11. 'Dynamic F1'	25. 'Midor F1'	39. 'Unikát F1'	
12. 'Galaktion F1'	26. 'Pavlo F1'	40. 'Zeus F1'	9. 'Rufus'
13. 'Hanibal F1'	27. 'Pluto'	41. 'Zora'	

Odrůdy hlávkového zelí se dělí podle délky vegetace na rané, letní polorané až polopozdní a pozdní. Dále na odrůdy vhodné k přímému konzumu a kruhárenské.

Sortiment nabízených odrůd se stále více orientuje na hybridní odrůdy poskytující vyšší vyrovnanost hlávek a tím i jejich lepší prodejnost, vyšší výnosy a lepší uchovatelnost. Šlechtění se orientuje především na jednotné dozrávání hlávek ke sklizni, které vyhovuje velkoproducentům, odolnost vůči chorobám, vhodnost ke skladování, ale i na zlepšení nutriční hodnoty a chuťových vlastností.

F1 hybridní rostliny (rostliny první filiální generace) vznikají kontrolovaným křížením inbredních rodičovských linií. Biologickým jevem u F1 generací je, že se projevují nadměrnou zdatností a vitalitou. To znamená, že u nich dochází k heteroznímu efektu, tedy vhodnou kombinací rodičovských rostlin dojde ke zlepšení vlastností. Vlastnosti F1 rostliny překonají vlastnosti rodičovských rostlin. Nevýhodou je skutečnost, že výjimečné vlastnosti F1 rostlin se s další generací (F2) opět ztrácí. Jediný způsob množení je proto pomocí rodičovských rostlin. S tím souvisí další nevýhoda F1 hybridních rostlin, kterou je nákladnost udržování rodičovských linií a následného křížení.



Obr. 5 Křížení a vznik F1 hybridů, ztráta výjimečných vlastností v F2 generaci.

3.2 Molekulární metody

Historicky se pro genetickou charakterizaci a stanovení vztahů mezi jedinci v rámci druhu používala kombinace morfologických a agronomických vlastností, později také biochemické testy, jako jsou spektra zásobních bílkovin a izozymová

spektra. Tyto charakteristiky jsou ale ovlivňovány podmínkami vnějšího prostředí a jejich využitelnost tedy byla občas diskutabilní. V současnosti se za nejspolehlivější zdroj informací pro posuzování genetické diverzity považuje sledování polymorfismu na úrovni DNA (Baránek *et al.*, 2006; Kalia *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2004; Hoshino *et al.*, 1999).

3.2.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (z anglického "*Polymerase Chain Reaction*") byla objevena v roce 1984. Objevil ji americký biochemik Kary Mullis, který za tento pro vědu důležitý objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu. Nicméně základní princip replikace části DNA za použití dvou primerů byl popsán již Gobindem Khoranaem v roce 1971. Je to významná vědecká metoda, která se rychle stala jednou z nejvíce používaných a nepostradatelných metod v molekulární biologii, v lékařských a biologických laboratořích pro celou řadu aplikací, protože je rychlá, nenákladná a jednoduchá. PCR je metoda, kdy se amplifikují (namnoží) specifické fragmenty DNA z minimálního množství zdrojového materiálu DNA, a to i když má tento zdroj DNA relativně nízkou kvalitu. PCR může amplifikovat použitelné množství DNA (viditelné pomocí gelové elektroforézy) za ~ 2 hodiny (Joshi a Deshpande, 2011).

Jak název napovídá, je to řetězová reakce: Jedna molekula DNA se používá k výrobě dvou kopií, pak čtyř, osmi a tak dále. Toto kontinuální zdvojnásobení je dosaženo pomocí specifických proteinů známých jako polymerázy (enzymy), které jsou schopny syntetizovat jednotlivé stavební složky DNA do dlouhých molekulárních řetězců. Ke své práci vyžadují polymerázy zásobu stavebních složek DNA, tj. nukleotidů sestávajících ze čtyř bází - adeninu (A), thyminu (T), cytosinu (C) a guaninu (G) (Joshi a Deshpande, 2011).

Tepelně stálé vlastnosti aktivity DNA polymerázy byly izolovány z bakterií *Thermus aquaticus* (Taq), které rostou v gejzírech s teplotami nad 110 °C, a významnou měrou přispěly k výnosu, specifičnosti, automatizaci a užitečnosti polymerázové řetězové reakce. Taq enzym vydrží opakovaný ohřev na 94 °C (Saiki *et al.*, 1988). Aby se zajistil úspěch, je třeba správně připravit reakční směs a nastavit podmínky cyklů.

Typická PCR se provádí za použití dvou oligonukleotidů o známých sekvencích, tzv. primerů (malých úseků DNA), které ohraničují amplifikované DNA fragmenty.

Tyto primery hybridizují s komplementárními místy obou protilehlých vláken, přičemž během reakce dochází k množení pouze těch sekvencí, které leží právě mezi těmito dvěma komplementárními místy. K růstu nových řetězců dochází prodlužováním primerů účinkem termostabilní DNA polymerázy. K namnožení fragmentů o konkrétní délce (amplifikaci) dochází v průběhu mnohokrát se opakujícího cyklu, který obsahuje tři kroky (Arnheim a Erlich, 1992).

V metodě PCR existují tři hlavní kroky:

1) Tepelná denaturace DNA

Obvykle se používá teplot v rozmezí 92 - 95 °C. Při těchto teplotách dochází k denuraci DNA spojené s rozpadem její dvoušroubovicové struktury na dva samostatné řetězce. Denurační krok je velmi důležitý, nedostatečná denaturace způsobuje snižování výtěžku produktů. Příliš vysoká denurační teplota může naopak vést ke ztrátě enzymatické aktivity polymerázy (poločas enzymatické aktivity Taq polymerázy je udáván na 2 hodiny při 92,5 °C, 40 minut při 95 °C a 5 minut při 97,5 °C) (Sambrook *et al.*, 1989).

2) Hybridizace primerů s komplementárními místy v rámci cílové DNA

Po denuraci teplota klesá. K fázi hybridizace primerů dochází při nižší teplotě, 50 - 60 °C (u RAPD metody jsou používány teploty obvykle kolem 36 °C). Obvyklá teplota hybridizace primerů (18 - 30 bazí) je v rozmezí 55 - 72 °C (Sambrook *et al.*, 1989). To umožňuje, aby primery hybridizovaly se svými komplementárními místy v templátové DNA. Nově vytvořený řetězec DNA primeru připojeného k šabloně je pak použit k vytvoření identických kopií původních žádoucích templátových vláken. Taq polymeráza přidává dostupné nukleotidy na konec, kde jsou napojené primery. K prodloužení primerů pomocí Taq polymerázy dochází při teplotě přibližně 72 °C po dobu 2 - 5 minut (Joshi a Deshpande, 2011).

Teplota a čas potřebný pro hybridizaci závisí na zastoupení jednotlivých bazí v primeru, jeho délce a koncentraci. Pro teoretický odhad vhodné teploty se využívá několika pravidel. Jako vhodná se např. doporučuje teplota 5 °C pod teoretickou hodnotou teploty tání primeru. Velmi často je ale nejvhodnější teplota pro hybridizaci primeru určována empiricky. Výběr optimální teploty pro hybridizaci primeru je kritickým faktorem pro specificitu a citlivost PCR reakce. Pokud je zvolena teplota

příliš nízká, může dojít k hybridizaci primeru s místy s neúplnou komplementaritou, což má za následek vznik nespecifických produktů. Naopak při příliš vysoké teplotě nedochází k hybridizaci primeru s templátovou DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

3) Růst nového řetězce účinkem termostabilní DNA polymerázy

Posledním krokem jednoho amplifikačního cyklu je růst nového řetězce, pro který se obvykle volí teplota 72 °C (maximální účinnost polymerázy). Čas prodlužování závisí na délce syntetizovaného řetězce, koncentraci, povaze templátové DNA a na již zmiňované teplotě. Pro Taq polymerázu byla určena rychlost syntézy při 72 °C na 35 až 100 nukleotidů za sekundu v závislosti na pufru, pH, koncentraci solí a vlastnostech templátové DNA. Čas pro růst nového řetězce zadaný na 1 minutu bude tedy určitě postačovat k syntéze 2 kb dlouhých fragmentů (Sambrook *et al.*, 1989).

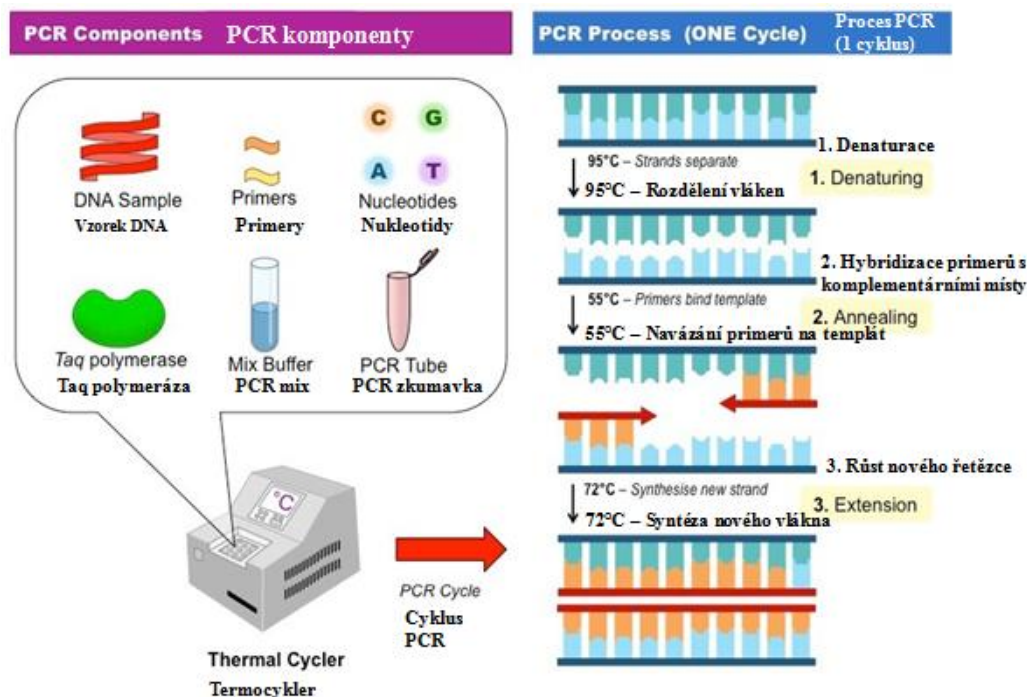
Cyklování

Po prvním cyklu jsou produkty ve formě dvoušroubovice. Každé takto nově vzniklé vlákno může působit jako samostatná templátová DNA v cyklu příštím. Je důležité připomenout, že po prvním cyklu v reakční směsi ještě nejsou žádné produkty konečné délky, protože syntéza nového řetězce často pokračuje podél prvního templátového řetězce daleko za místo komplementarity primeru s druhým řetězcem. S rostoucím počtem cyklů ale exponenciálně roste počet "ořezaných" PCR produktů o konkrétní délce řetězce, a to podle vzorce:

$$N = n \cdot (1+E)^C$$

n - počáteční množství cílové sekvence E - účinnost amplifikace
N - konečné množství produktu C - počet použitých PCR cyklů

Obvykle k detekovatelným výtěžkům postačí provést 30 až 40 cyklů (Sambrook *et al.*, 1989). Zvýšení počtu cyklů nad ~ 35 má jen malý pozitivní efekt, protože vrchol nastane, když jsou složky PCR směsi vyčerpány. Specifičnost amplifikace závisí na tom, do jaké míry mohou primery rozpoznávat a vázat se na jiné než určené cílové sekvence DNA (Joshi a Deshpande, 2011). Tradičně se PCR provádí v mikrozkumavce, a když je reakce ukončena, jsou produkty reakce (amplifikované fragmenty DNA) analyzovány a vizualizovány gelovou elektroforézou (Joshi a Deshpande, 2011).



Obr. 6 Princip PCR reakce (BioNinja, 2016)

Všeobecné kroky metody PCR (Kumari a Thakur, 2014):

1. Extrakce DNA
2. Kvalitativní a kvantitativní kontrola extrahované DNA
3. Výběr primerů
4. PCR amplifikace
5. Elektroforéza DNA amplifikované pomocí PCR na agarózovém gelu
6. Statistické analýzy

Použití PCR:

Metoda PCR pomáhá při vyšetřování a diagnostice rostoucího počtu onemocnění. Dlouhou dobu to byla také standardní metoda ve všech laboratořích, které provádějí výzkum na nukleových kyselinách nebo s nimi pracují. I konkurenční techniky, jako jsou DNA čipy, často vyžadují amplifikaci DNA pomocí PCR jako základní úvodní krok. Polymerázová řetězová reakce je používána širokým spektrem vědců ve stále rostoucím rozsahu vědeckých oborů. V oboru mikrobiologie a molekulární biologie, je

PCR například používána ve výzkumných laboratořích v postupech klonování DNA, Southern blottingu, sekvenování DNA, technologie rekombinantní DNA a dalších. V klinických laboratořích mikrobiologie je PCR neocenitelná pro diagnózu mikrobiálních infekcí a epidemiologických studií. PCR se také používá ve forenzních laboratořích a je zvláště užitečná, protože je zapotřebí jen malé množství původní DNA, například dostatečné množství DNA může být získáno z kapky krve nebo jednoho vlasu. Kvalitativní PCR může být samozřejmě použita k detekci nejen lidských genů, ale také genů bakterií a virů. Mnoho virů obsahuje spíše RNA než DNA. V takových případech musí být virový genom před provedením PCR přepsán, a proto se používá RT-PCR. Metoda PCR může detekovat DNA mikroorganismů v jakémkoliv vzorku, ať už v tělesných tekutinách, potravinách nebo pitné vodě (Joshi a Deshpande, 2011).

Během posledních dvou desetiletí se molekulární techniky staly čím dál více populární pro analýzu taxonomických a evolučních vztahů. Od prvního zveřejnění PCR umožnila amplifikace a sekvenování markerových genů (které nekontrolují morfologický fenotyp rostliny) analyzovat velký soubor taxonů ve srovnatelně krátké době (Wink, 1994).

PCR metoda způsobila převrat genetických a ekologických analýz populací v několika směrech, protože má dvě velké výhody ve srovnání s markery na bázi Southern blot. Za prvé, vyžaduje jen malé množství DNA a umožňuje tak analýzy ve velmi rané fázi, čímž se sníží potřeba rostlinných školek. Za druhé, není finančně náročná, a je dost jednoduchá, takže mohou být rychle provedeny pokusy ve velkém měřítku. Z mnoha technik PCR markerů, které byly vyvinuty, jsou hlavními systémy RAPD, AFLP a SSR, a ostatní systémy jsou modifikace těchto tří (Park *et al.*, 2009).

3.2.2 Molekulární metody založené na PCR

V současnosti existuje velké množství metod odvozených od PCR, např. RAPD, SSR, AFLP a další. Tyto metody se od sebe mohou lišit cílovou oblastí DNA, která je amplifikována – jestli sledujeme celý genom, oblasti mikrosatelitů nebo např. DNA nebo RNA patogenů, zda získané znaky jsou dominantní nebo kodominantní, zda je metoda opakovatelná.

3.2.2.1 RAPD

RAPD metoda z anglického "*Random Amplified Polymorphic DNA*" - polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů DNA, byla poprvé popsána v roce 1990 dvěma nezávisle na sobě pracujícími skupinami (Williams *et al.*, 1990; Welsh a McClelland, 1990) a nazývána jako RAPD a AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*). V posledních desetiletích je tato metoda, založená na polymerázové řetězové reakci (PCR), jednou z nejčastěji používaných molekulárních technik pro vývoj DNA markerů (Kumar a Gurusubramanian, 2011). Segmenty DNA, které jsou amplifikovány, jsou v analýze RAPD náhodné.

Oproti klasické PCR využívá standardní metoda RAPD (Williams *et al.*, 1990), krátké syntetické oligonukleotidy (10 bází) náhodných sekvencí jako primery pro amplifikaci nanogramů množství celkové genomové DNA. K hybridizaci primeru při PCR dochází za nízkých teplot (obvykle kolem 36 °C). Produkty amplifikace se obvykle separují na agarózovém gelu a barví se ethidiumbromidem nebo jiným interkalačním barvivem, např. GelRed (Biotium).

Hlavní výhodou je, že není zapotřebí žádná znalost sekvence DNA cílového genu (Kumar a Gurusubramanian, 2011), je vhodná pro práci na anonymních genomech, použitelná při problémech, pokud jsou k dispozici pouze omezená množství DNA, je rychlá, jednoduchá a efektivní, s nízkými jednotkovými náklady na test. Dekamerní primery jsou komerčně dostupné z různých zdrojů (např. Operon Technologies Inc., Alameda, California, Biosciences, Bangalore, Euofinns, GCC Biotech, Kolkata) (Kumar a Gurusubramanian, 2011; Kumari a Thakur, 2014).

Nevýhodou je, že téměř všechny RAPD markery jsou dominantní, což znamená, že není možné rozlišit, zda je segment DNA amplifikován z lokusu, který je heterozygotní (1 pruh) nebo homozygotní (2 pruhy) (Kumar a Gurusubramanian, 2011). Navíc, nepřítomnost proužku v důsledku nedostatku cílové sekvence nelze odlišit od těch, které se vyskytují díky nedostatku amplifikace z jiných důvodů (např. špatné kvality DNA), což přispívá k nejednoznačnosti v interpretaci výsledků. Kodominantní RAPD markery jsou detekovány jen zřídka. RAPD technika je významně závislá na laboratoři a potřebuje pečlivě rozpracované laboratorní protokoly, aby byla reprodukovatelná (Kumar a Gurusubramanian, 2011).

RAPD markery našly širokou škálu uplatnění v genovém mapování, populační genetice, molekulární evoluční genetice, a ve šlechtění rostlin a zvířat. Například u taxonů *Brassica*, *Sinapis* a *Raphanus* bylo zkoumáno potenciální použití RAPD markerů pro taxonomické studie (Demeke *et al.*, 1992).

RAPD metodu se nedoporučuje využívat jako hlavní nástroj v experimentech zaměřených na identifikaci fenotypu (odrůdy) u neznámého vzorku. V tomto případě je RAPD doporučována spíše jako doplňková metoda k metodě SSR (Baránek *et al.*, 2006).

3.2.2.2 AFLP

Metodu AFLP (Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů z anglického "*Amplified Fragment Length Polymorphism*") popsali v roce 1995 Vos a kolektiv (Vos *et al.*, 1995). AFLP technika je založena na selektivní PCR amplifikaci restričních fragmentů z celkového výběru genomové DNA. Tato technika zahrnuje tři kroky: (i) restrikci DNA a ligaci oligonukleotidových adaptorů, (ii) selektivní amplifikaci sady restričních fragmentů, a (iii) gelovou analýzu amplifikovaných fragmentů. PCR amplifikace restričních fragmentů je dosaženo použitím adaptoru a sekvence restričního místa jako cílových míst pro nasednutí primerů. Selektivní amplifikace je dosaženo použitím primerů, které prodlužují restriční fragmenty, amplifikující pouze ty fragmenty, ve kterých primerová prodloužení odpovídají nukleotidům lemujícím restriční místa. Při použití této metody mohou být sady restričních fragmentů vizualizovány pomocí PCR bez znalosti nukleotidové sekvence (Vos *et al.*, 1995).

I když je tato metoda drahá, ukázala se jako velmi účinná a výkonná ve srovnání s jinými molekulárními technikami, jako jsou RFLP a RAPD, díky své schopnosti detekovat různé polymorfismy v různých oblastech genomu, které umožňují rozlišení blízce příbuzných druhů. Také díky vysoce reprodukovatelným datům a většímu počtu amplifikovaných produktů vytvořených v jedné reakci (Villalobos-Barrantes *et al.*, 2015).

Tato metoda byla úspěšně použita pro studium fylogeneze a genetické diverzity u rodu *Brassica* (Faltusová *et al.*, 2011; van Hintum *et al.*, 2007; Genet *et al.*, 2005) a mnoha dalších druhů rostlin, například u sezamu (Laurentin a Karlovsky, 2006) a brambor (Wang *et al.*, 2011).

3.2.2.3 SSR (*Simple sequence repeat* - opakující se jednoduché sekvence – mikrosatelity)

Mikrosatelity jsou různě dlouhé tandemově opakované motivy (repetice nukleotidů), které jsou distribuovány v celém eukaryotickém jaderném genomu, v kódujících i nekódujících oblastech (Jarne a Lagoda, 1996). Studie v letech 1983 (Delseny, *et al.* 1983) a 1984 (Tautz a Renz, 1984) potvrdily hojnost mikrosatelitů v rostlinách a v mnoha dalších eukaryotických organismech. Jsou to oblasti v DNA složené z mnohokrát se opakujících jednoduchých motivů o délce 1 - 6 nukleotidů jako jsou např. $(A/T)_n$, $(AG/CT)_n$, $(GATA/TATC)_n$, které nazýváme jednotky repetice (Rosypal *et al.*, 2001). Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 pb. Rostliny jsou bohaté na jednotky repetice AT, zatímco u zvířat je nejběžnější repetice AC (Park *et al.*, 2009). Vzhledem ke své struktuře a tandemovému uspořádání bývají mikrosatelity někdy označovány jako krátké tandemové repetice, STR (*short tandem repeats*), nebo repetice jednoduchých sekvencí, SSR (*simple sequence repeat*) (Park *et al.*, 2009). Odhaduje se, že 14 % z genů eukaryotických druhů obsahuje opakující se sekvence, což je přibližně třikrát více než u prokaryot (Marcotte *et al.*, 1999). Odhaduje se také, že počet mikrosatelitů u genomů rostlin je například přibližně pětikrát nižší než v lidském genomu (Beckmann a Weber, 1992).

Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý satelit je tvořen souvislou jednotkou repetice, např. $(AG)_{24}$, u nedokonalého mikrosatelitu je jednotka repetice přerušena sledem náhodných bází. Složený mikrosatelit je tvořen několika různými jednotkami repetice, např. $(AG)_{14}(AT)_{35}$. Dále bylo pozorováno, že nejhojnější jsou dinukleotidové mikrosatelity, z nich pak jednotka repetice $(AT)_n$. Nejméně četné jsou mono- a tetranukleotidové mikrosatelity. V případě trinukleotidových repetací jsou pak nejčetnější $(AAG/CTT)_n$ a $(AAT/AAT)_n$ (Beckmann a Weber, 1992).

Analýzy distribuce mikrosatelitů v genomech mnoha druhů zjistily, že ve srovnání s *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Caenorhabditis elegans* a kvasinek, jsou lidské chromozomy 21 a 22 bohaté na mono- a tetranukleotidová opakování. Chromozomy u *Drosophila* mají vyšší frekvence di- a trinukleotidových opakování a překvapivě genom *Caenorhabditis elegans* obsahuje méně SSR na milion párů bází sekvence než kvasinkový genom (Katti *et al.*, 2001).

Metoda SSR

Mikrosatelity jsou obvykle rovnoměrně rozmístěny napříč genomem a vykazují relativně vysokou míru polymorfismu mezi jednotlivými genotypy, která je obvykle způsobována rozdílným počtem opakujících se jednotek repetice. Této skutečnosti se snaží využít molekulárně-genetická metoda SSR. Ta je založena na tom, že jsou navrženy primery z relativně konzervativních sekvencí v těsné blízkosti s mikrosatelitním lokusem. Sekvence PCR primerů sousedících s tandemovými repeticemi mikrosatelitů jsou obvykle navrhovány tak, aby jejich délka dosahovala 17 - 22 pb, aby se obsah G a C pohyboval alespoň okolo 50 % a aby se vypočítaná hodnota T_m (teplota tání primerů, tzv. melting temperature) pohybovala kolem 60 °C. Další samozřejmou podmínkou je to, aby oba navržené primery nevykazovaly vnitřní a vzájemnou komplementaritu, v opačném případě totiž může být silně narušován průběh PCR reakce. Pro snadnou detekci produktů amplifikace, jsou primery obvykle navrženy tak, aby se velikost produktu amplifikace pohybovala v rozmezí 100 - 300 pb, přičemž v rámci produktu je samozřejmě amplifikován i příslušný mikrosatelit. Jak již bylo řečeno, polymorfismus mezi genotypy je obvykle zapříčiněn různým počtem opakování jednotky repetice. Při detekci produktů PCR reakce to znamená, že se jednotlivé alely liší ve své délce o délku jednotky repetice daného mikrosatelitu (tzn. při jednotce repetice AT bude obvyklý rozdíl mezi alelami 2 pb, při jednotce repetice ATT bude obvyklý rozdíl mezi alelami 3 pb) (Rosypal *et al.*, 2002).

SSR Markery

Systémy DNA markerů, které byly zavedeny do genetické analýzy v osmdesátých letech 20. století, mají mnoho výhod oproti tradičním morfologickým a proteinovým markerům, které se používají v genetických a ekologických analýzách populací rostlin: za první - DNA markerů může být generováno neomezené množství; za druhé - profily DNA markerů nejsou ovlivněny okolním prostředím, a za třetí - DNA markery, na rozdíl od izoenzymových markerů, nejsou omezeny tkání nebo specifitostí vývojového stádia (Park *et al.*, 2009).

SSR metoda vytváří systém molekulárních markerů pro posouzení genetické diverzity v rostlinách, lze ho uplatnit i u opomíjených a minoritních plodin či ohrožených druhů. Mikrosatelity byly původně navrženy pro výzkum degenerativních a neurologických onemocnění u lidí, ale prokázaly velkou použitelnost

i pro ostatní druhy (Hoshino *et al.*, 1999). U rostlin, byla přítomnost SSR poprvé prokázána hybridizací oligonukleotidových sond poly (G-T) a poly (A-G) na fágových knihovnách z genomu tropického stromu (Condit a Hubbell, 1991). Hoshino *et al.* (1999) uvádí, že mikrosatelity patří mezi nejslibnější markery založené na PCR.

Velký počet mikrosatelitních markerů je nyní k dispozici pro kompletně sekvenované genomy rostlin, jako je rýže (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Mikrosatelity se staly voleným markerem pro řadu testů u rostlin v důsledku hypervariabilní povahy a pokrytí rozsáhlého genomu. Jsou používány k posouzení genetické proměnlivosti na molekulární úrovni v kolekci genofondu, pro správnou volbu rodičů kříženců (tj. šlechtění hybridů), mapování a značení genů nebo QTL (quantitative trait loci) pro agronomické znaky a geny rezistence k chorobám, mapování genomu, MAS slibných linek a markery asistovaným zpětným křížením (MAB) během šlechtitelských programů, identifikaci pohlaví, studiu struktury populace a taxonomických a fylogenetických vztahů (Kalia *et al.*, 2011). Tyto markery jsou také využívány i v mezinárodních databázích, např. u révy vinné *Vitis vinifera* L. (eu-vitis.de).

Vazbová mapování pomocí SSR markerů byla úspěšně vytvořena u mnoha důležitých plodin, jako jsou brambory, kukuřice, pšenice a sója (Wang *et al.*, 2009). Od doby jejich vývoje jsou mikrosatelitní markery neustále izolovány a charakterizovány u celé řady rostlin, včetně obilovin, luštěnin, zeleniny, lesních dřevin, ovocných rostlin, jehličnanů a dalších ekonomicky významných druhů rostlin. Stálý pokrok a rozvoj těchto markerů ztraktivní molekulární šlechtění a genetiku rostlin a nakonec pomůže při zlepšování zemědělských plodin (Kalia *et al.*, 2011).

Detekční metody SSR produktů¹

Mezi metody nejčastěji používané k určování velikosti produktů SSR amplifikace a ke sledování jejich polymorfismu patří elektroforéza na agaróze, polyakrylamidová gelová elektroforéza (dále PAGE), denaturační PAGE a kapilární elektroforéza.

¹ Celá tato kapitola vychází ze skript Biotechnologie v zahradnictví, návody pro praktická laboratorní cvičení (Baránek *et al.*, 2006)

U agarózových gelů se jako barvivo pro vizualizaci DNA nejčastěji používá ethidiumbromid nebo méně toxický GelRed, který interkaluje do DNA a umožňuje detekci produktů po PCR. Jednoduchost použití těchto gelů však přináší i jisté nevýhody. V případě agarózy je nevýhodou její nižší rozlišovací schopnost, i když v poslední době byly vyvinuty speciální agarózy se zvýšenou separační schopností. Jednou z nich je agaróza MetaPhor (výrobce BMA Products), u které výrobce deklaruje možnost rozlišení DNA fragmentů lišících se alespoň o 2 % v jejich délce. Nevýhodou u nedenační PAGE je možnost rozdílné elektromigrační rychlosti u fragmentů se stejným počtem bází, ale s rozdílným složením a sekvencemi.

Přesné určování velikosti alel proto vyžaduje použití denaturační PAGE nebo kapilární elektroforézy. V PAGE jsou amplifikační produkty SSR detekovány nejčastěji barvením stříbrnými kationty, radioaktivním značením (primer nebo PCR produkt) nebo fluorescenčním barvením (primer nebo PCR produkt). Nevýhodou PAGE je nutnost manipulace s akrylamidem, který má karcinogenní vlastnosti.

U kapilární elektroforézy je nejčastějším způsobem detekce produktů prostřednictvím fluorescenčního barvení použitých primerů. Výhodou je, že je možné použít tři páry různě fluorescenčně značených primerů zároveň, a proto je tato detekce rychlejší a efektivnější. V případě vhodně zvolené velikosti produktu u primerových kombinací, lze použít až šest primerových párů (v případě jedné kapiláry). U kapilární elektroforézy jsou pak nevýhodou poměrně vysoké náklady analýz.

Výhody a srovnání mikrosatelitních markerů s ostatními markery

SSR markery mají mnoho výhod oproti ostatním markerovým systémům. První výhodou je jejich vysoká reprodukovatelnost, což je při genetické analýze velmi důležité. Reprodukovatelnost profilu SSR je tak rozsáhlá jako u RFLP (Park *et al.*, 2009). Ve srovnání s RFLP technikou kladou mikrosatelity menší nároky na laboratorní vybavení, vyžadují mnohem nižší množství izolované DNA, vykazují vyšší polymorfismus a jsou potenciálně automatizovatelné. Jelikož je každý lokus definován konkrétní primerovou sekvencí, mohou být výsledky SSR analýz snadno porovnány mezi různými pracovišti, na rozdíl od metod AFLP a RAPD. Je ovšem třeba brát v potaz možné problémy se správným určením velikosti výsledných produktů, kdy určená délka alel se může mezi různými experimenty i v rámci jednoho pracoviště mírně měnit (Baránek *et al.*, 2006). Vzhledem k tomu, že SSR analýza nevyžaduje

restrikční enzymy, může reprodukovat stejné profily bez ohledu na stav templátové DNA. Rovněž nevyžaduje, aby byla templátová DNA ultra čistá, což je podmínkou pro analýzu AFLP, jelikož kontaminovaná nebo nečistá DNA často při štěpení restrikčními enzymy produkuje nespécifické rušivé pruhy (Park *et al.*, 2009).

Druhou výhodou markerového systému SSR je obsah polymorfní genetické informace. Hyper-variabilní povaha SSR produkuje velmi vysoké alelické variace dokonce i mezi velmi úzce příbuznými druhy (Park *et al.*, 2009). Ve srovnávací studii o užitečnosti systémů RFLP, RAPD, AFLP a SSR markerů pro analýzu genových zdrojů, SSR ukázala nejvyšší očekávanou heterozygotnost, zatímco AFLP měla nejvyšší efektivní multiplexní poměr (Powell *et al.*, 1996).

Třetí výhodou je kodominantní charakter SSR markerů, což je přínosné zvláště při jejich aplikacích v procesu genetického mapování. Kodominantní charakter SSR je vhodný pro genetickou analýzu v segregaci F2 populací nebo analýzu rodičovství u hybridů (Scott *et al.*, 2000).

Čtvrtou výhodou markerového systému SSR je jejich množství a distribuce v genomech. Jak je identifikováno více a více genomických sekvencí u různých eukaryotických druhů, je stále více zřejmé, že SSR jsou opravdu hojné téměř u všech druhů, a jsou dobře distribuovány skrz celé jejich genomy (Wang *et al.*, 1994).

Díky těmto vlastnostem a jejich poměrně snadné detekci jsou SSR markery v současné době velmi často využívány.

Využití mikrosatelitů u zemědělských plodin a rodu *Brassica*

Metoda SSR byla použita u velkého množství zemědělských plodin, například Sudharani *et al.* (2014) identifikovali SSR markery pro testování hybridnosti a genetické čistoty osiva u kukuřice (*Zea mays* L.). Mezi 12 testovanými mikrosatelitními markery, byly pouze dva schopny vytvářet komplementární pruhy mezi hybridem DHM-117 a jeho odpovídajícími rodičovskými samičími a samčími liniemi. PCR produkty byly separovány na 3 % agarózovém gelu. Bylo zjištěno, že hybridní kukuřice DHM-117 se zřetelně liší od svých rodičovských linií. Testování genetické čistoty čtyřiceti náhodně vybraných hybridních rostlin DHM-117 ve dvou sadách po dvaceti s vybraným markerem ukázala 100 % čistotu u vybraných rostlin v první sadě, avšak ve druhé sadě se ukázalo pět rostlin jako nehybridní typy.

Další studie zabývající se genetickou čistotou osiva a SSR markery byly provedeny např. u slunečnice (*Helianthus annuus* L.) (Pallavi *et al.*, 2011), kdy bylo 58 primerů podrobena skříninku pro identifikaci specifického markeru spojeného s každou hybridní a rodičovskou linií. Tato studie využila metodu SSR pro identifikaci pěti hybridů slunečnice spolu s jejími rodičovskými liniemi. Pro separaci PCR produktů byl použit 6 % polyakrylamidový gel, protože i přes objevení PCR produktů vzorků DNA, nedošlo na 3,5 % agaróze k ukázání polymorfismu mezi hybridy a jejich rodičovskými liniemi. Výsledkem bylo, že dva SSR primery mohou být spolehlivě použity pro identifikaci odrůdy KBSH-44, a další SSR primer pro identifikaci i pro testování genetické čistoty u odrůdy KBSH-53.

Maniok (*Manihot esculenta* Crantz) byl šlechtěn na odolnost k chorobě CDM (*Casava mosaic disease*). Bylo použito 75 SSR primerů a 57 z nich produkovalo polymorfnní pruhy mezi rodiči. Tyto primery byly proto aplikovány na 153 F1 hybridních rostlin. Nakonec pouze šest párů primerů amplifikovalo jednoduchý marker, který jasně odlišoval rodičovské rostliny od F1 hybridních rostlin (Mohan *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2014) studovali použití SSR markerů při hodnocení genetické čistoty komerčních hybridů sóji (*Glycine max* L.). Aby se předešlo snížení výtěžku způsobenému použitím semen s nízkou čistotou hybridnosti, má velký význam vývoj jednoduché, rychlé a přesné metody hodnocení hybridní čistoty. Proto byly rodičovské linie podrobeny skříninku za použití 160 SSR markerů, z nichž 8 markerů vykazovalo polymorfismus. Analýza založená na PCR s těmito markery detekovala alely rodičovských linií v čistých hybridech, prokazující jejich heterozygotnost, zatímco nehybridní jedinci byli identifikováni přítomností pouze jedné rodičovské alely.

Liu *et al.* (2008) testovali genetickou čistotu F1 hybridu rajčete (*Solanum lycopersicon* L.) pomocí molekulárních markerů. V této studii byly použity tři systémy molekulárních markerů - RAPD, ISSR a SSR pro testování genetické čistoty hybridního osiva rajčete 'Hezuo906'. Genetické vztahy hybridů a jejich dvou rodičů byly analyzovány pomocí celkem 321 primerů, z toho 49 SSR primerů. Dva kodominantní SSR primery byly vybrány pro testování genetické čistoty hybridního osiva. Pomocí vybraných primerů bylo testováno celkem 208 hybridních jedinců. Výsledkem bylo,

že 10 z 208 jedinců 'Hezuo906' nebylo hybridních a genetická čistota hybridního osiva byla stanovena na 95,1 %.

Mikrosatelity jsou v současné době využívány také při studiu rodu *Brassica*. Nyní mohou být identifikovány genově odvozené SSR v rámci stávajících veřejných databází sekvencí také pro *Brassica oleracea* L., i přestože je k dispozici jen několik markerů tohoto typu (Love *et al.*, 2004).

V práci Louarn *et al.*, (2007) bylo testováno padesát devět odrůd *Brassica oleracea* L. patřících k pěti botanickým druhům na přítomnost mikrosatelitních (SSR) polymorfismů použitím jedenácti párů primerů odvozených z databáze sekvencí. Tyto odrůdy byly zastoupeny dvanácti brokolicemi (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), deseti růžičkovými kapustami (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* (DC.) Zenker), jednadvaceti zástupci zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata* L., zahrnující skupiny bílého a červeného zelí), šesti kapustami (*Brassica oleracea* var. *sabauda* L.), a deseti květáky (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). Odrůdy pocházely od třinácti dodavatelů osiva. Těchto jedenáct párů primerů amplifikovalo celkem čtyřicet sedm fragmentů, a rozlišilo padesát jedna odrůd, zatímco zbývajících osm kultivarů bylo odlišeno od zbytku čtyřmi neoddelitelnými páry. Nebyl nalezen žádný významný rozdíl v rozmanitosti uvnitř rostlinných druhů a skupin. Shluková analýza a výsledný dendrogram ukázaly, že kultivary mají tendenci se shlukovat v rámci těchto taxonomických jednotek (Louarn *et al.*, 2007).

Další studie hodnotí pomocí mikrosatelitních (SSR) markerů genetickou diverzitu, strukturu populace a vztahy *Brassica oleracea* L. genových kolekcí v Irsku. Celkem 25 vzorků *Brassica oleracea* L. bylo získáno z genové sbírky udržované v Horticultural Research Institutu (HRI) ve městě Wellesbourne ve Velké Británii. Tyto vzorky zastoupovaly 4 dílčí poddruhy v rámci druhů *Brassica oleracea* (*Brassica oleracea* var. *capitata* L., *Brassica oleracea* var. *acephala* DC., *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. a *B. oleracea* var. *gemmifera* (DC.) Zenker). Bylo vybráno sedmnáct sad souborů SSR primerů specifických pro chromozomy rodu *Brassica*. Dvanáct primerů vykazovalo polymorfismus a bylo použito k analýze všech vzorků. Bylo zjištěno, že lokusy SSR jsou signifikantně polymorfní a efektivní pro rozlišování mezi studovanými vzorky. Pozorovaná heterozygotnost byla u všech vzorků vyšší, než se očekávalo. Většina genetické variability se nacházela v rámci vzorků. Tyto genetické znaky irské *Brassica*

oleracea L. by mohly poskytnout pochopení a směrnice pro ochranu tohoto druhu před vyhynutím stejně jako rozvoj vlastní praktické strategie ochrany. Tato studie také poskytla nové zajímavé výsledky a poskytuje pochopení výběru a použití vzorků nejvíce variabilních druhů jarního zelí, zde určených jako potenciální zdroje pro budoucí šlechtitelské programy k rozvoji nových a produktivnějších plodin. SSR markery se ukázaly být efektivní platformou pro studie charakterizace a mapování genových zdrojů rodu *Brassica* (El-esawi *et al.*, 2016).

Ye *et al.* (2013) testovali genetickou čistotu osiva zelí F1 hybridní odrůdy 'Sugan 21' pomocí molekulárních markerů založených na PCR zahrnujících SSR, RAPD, ISSR (*intersimple sequence repeat*) a SRAP (*sequence-related amplified polymorphism*). Z celkového počtu 325 primerů bylo testováno 85 SSR primerů, z nichž tři kombinace primerů dokázaly produkovat u F1 hybridů současně markery FPS (female parent-specific = specifické pro samičího rodiče) i MPS (male parent-specific = specifické pro samčího rodiče). Amplifikované produkty byly separovány na 8 % nedenaturujících polyakrylamidových gelech a detekovány pomocí stříbrného obarvení. Testování 216 F1 hybridních rostlin ukázalo, že tři rostliny produkovaly pouze FPS markery a jedna pouze MPS markery, zbylých 212 hybridních jedinců produkovalo jak FPS, tak i MPS markery a genetická čistota F1 hybridních semen byla proto stanovena na 98,15 %.

Liu *et al.* (2007) použili čtyři stejné molekulární markerové systémy pro hodnocení genetické čistoty hybridního osiva kultivaru zelí 'Zaoxia 16' jako předchozí Ye *et al.* (2013). Jednalo se tedy o markerové systémy SSR, RAPD, ISSR a SRAP. Genetické vztahy F1 hybridů a jejich rodičů byly analyzovány pomocí 339 primerů, z toho 44 SSR primerů. Pouze dva z vybraných SSR primerů produkovaly zároveň FPS i MPS markery a byly vybrány pro testování genetické čistoty hybridního osiva. 210 hybridních rostlin 'Zaoxia 16' bylo podrobena skříninku s vybranými dvěma primery a genetická čistota byla stanovena na 94,8 %.

V České republice byla testována použitelnost vybraných SSR markerů při rozlišení rodičovských rostlin od jejich potomstva u sedmi rodin zelí. Výsledkem těchto testů bylo určení dvou markerů, které se vzájemně doplňují a jejichž použitím lze rozlišit téměř všechny testované rodiny zelí. Nadějně mikrosatelitní markery byly analyzovány další metodou, která potvrdila využití těchto mikrosatelitních markerů v praxi (Sochorová, 2014).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

Byly analyzovány 3 odrůdy (9 genotypů vždy v trojkombinaci - jeden hybrid a dvě k němu odpovídající rodičovské linie) *Brassica oleracea* var. *capitata* L., které poskytla komerční firma. Semena byla naklíčena a byly odebrány první dva lístky, které byly vloženy do zkumavek a zmraženy na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 3 Seznam sledovaných odrůd

Pořadí	Odrůda
1	D - F1
2	D - lin1
3	D - lin2
4	H - F1
5	H - lin1
6	H - lin2
7	T - F1
8	T - lin1
9	T - lin2

4.2 Expresní izolace DNA

DNA byla izolována podle metodiky Klimyuk *et al.* (1993). Do mikrozkušavky s rostlinným vzorkem o velikosti 0,5 cm v průměru bylo přidáno 80 μl pufru (0,25 M NaOH) a na dno drcený prášek z granátu (Bio 101 Systems), který sloužil pro dokonalé rozdrcení rostlinného materiálu. Zkušavky byly umístěny do homogenizátoru Fastprep (Bio 101 Systems, ThermoSavant) na 46 s při nejvyšší rychlosti, dále byly vzorky zcentrifugovány při 3000 otáčkách za minutu a umístěny na 30 s do termobloku, při teplotě $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí z termobloku byly vzorky okamžitě přeneseny na led. Dále bylo do zkumavek přidáno 40 μl 0,25 M HCl a 20 μl předem připravené směsi Tris pH 8,0 (do 50 ml Trisu bylo přidáno 0,125 μl Nonidetu) s 0,25 % Nodinet P-40. Obsah zkumavy byl protřepán na minitřepačce, aby došlo k dokonalému promíchání. Následovalo umístění na 2 minuty do termobloku při $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí zkumavek bylo provedeno opět jejich prudké zchlazení na ledu. Vzorky byly uchovávány

v mrazáku a před každým opětovným použitím při PCR reakci bylo třeba DNA povařit 1 minutu v termobloku při 105 °C.

Čistota a kvalita DNA po izolaci DNA z rostlinného materiálu byla stanovena elektroforetickou separací vzorků DNA na 0,8 % agarózovém gelu na horizontální elektroforéze ve srovnání se standardem λ -DNA o známé koncentraci (100 a 200 ng v 10 μ l).

4.3 SSR analýza

DNA byla získána z 9 genotypů vždy v trojkombinaci - jeden hybrid a dvě k němu odpovídající rodičovské linie. Bylo analyzováno vždy 70 vzorků hybridního potomstva a dva vzorky rodičovských linií ve dvou sadách po 35 vzorcích hybridů. Objem 2 μ l z každého vzorku vyizolované DNA byl smíchán s 12 μ l PCR mixu (viz Tab. 4).

Amplifikační podmínky vycházely z práce Sochorová (2014). Amplifikace proběhla v objemu 12 μ l a reakční směs obsahovala 1x PCR Buffer, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μ M primer, 1 jednotku Taq polymerázy (Go-Taq G2 Flexi - Promega) a 2 μ l (20 ng) templátové DNA.

Tab. 4 Chemikálie pro reakční směs PCR

Reagencie	Koncentrace k reakci	1x reakce (μ l)	44x reakce (μ l)
H ₂ O		6,3	277,2
Flexi pufr (5x)	1x	2,5	110
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	0,75	33
dNTPs (25 mM)	0,1 mM	0,1	4,4
Primer 1 (10 μ M)	0,4 μ M	0,25	11
Primer 2 (10 μ M)	0,4 μ M	0,25	11
BSA 1%		0,125	5,5
PVP 10%		1,25	55
Barvivo Flexi (od výrobce)		0,325	14,3
Go-Taq G2 Flexi 5U / μ l polymeráza	1 U	0,15	6,6
Celkem:		12 μ l	528 μ l

4.3.1 Použité SSR primery testované v této diplomové práci

Dle výsledků skříninku F1 hybridů a jejich rodičovských linií provedeného v rámci výzkumného projektu na pracovišti Mendeleum a podle doporučení školitele,

byly vybrány primery, které se jeví jako vhodné pro rozlišení rodičovských linií a jejich hybridů, ale bylo potřeba ověřit jejich účinnost v rámci hybridních potomstev.

Tab. 5 Použité primery vybrané podle doporučení školitele

Označení			T _m °C	Očekávaná velikost produktu	Program
Br23	LEFT	BoESSR073	59,4	220-260	Brass49
	RIGHT	BoESSR073	55,3		
Br25	LEFT	CALSSR	57,3	140-200	Brass47
	RIGHT	CALSSR	57,3		
Br27	LEFT	CB10229	51,1	270-295	Brass41
	RIGHT	CB10229	51,4		
Br29	LEFT	CB10427	51,4	150-180	Brass44
	RIGHT	CB10427	53,7		
Br30	LEFT	CB10629	52	100-150	Brass46
	RIGHT	CB10629	56		
Br32	LEFT	sN11670	59,4	150-200	Brass49
	RIGHT	sN11670	55,3		
Br33	LEFT	BnGM8160	51,1	280-380	Brass43
	RIGHT	BnGM8160	53,2		
Br36	LEFT	PBCGSSRBo33	56	120-150	Brass47
	RIGHT	PBCGSSRBo33	57,3		

4.3.2 Teplotní program termocyklu

Amplifikace proběhla v termocyklu (Biometra) podle programu Sochorová (2014), viz Tab. 6. Teplota nasednutí primeru byla nastavena podle teplot doporučených pro primery z předchozího skřínku. Jednalo se o tzv. sestupný program (touch down protokol), kdy 1. nasednutí primeru (annealing) probíhalo při vyšší teplotě pro zvýšení specifičnosti PCR reakce, dále byla snížena teplota v každém z deseti cyklů o – 1 °C, takže se dále amplifikovaly pouze požadované produkty pro odpovídající teplotu primeru (25 cyklů).

Horizontální elektroforéza na agarózovém gelu:

Pro rozlišení produktů DNA jednotlivých genotypů byly následně vzorky elektroforeticky separovány na 2 % agarózovém gelu na horizontální elektroforéze Agagel Maxi Biometra© v pufru TAE 1x. DNA byla zviditelněna přidávkem interkalačního barviva GelRed (Biotium) v koncentraci podle doporučení výrobce (Sambrook *et al.*, 1989). Pro zjištění velikostí produktů po PCR reakci byl použit hmotnostní a délkový standard 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs).

Elektroforetické záznamy byly na transiluminátoru fotograficky zdokumentovány pomocí fotoaparátu propojeného s PC.

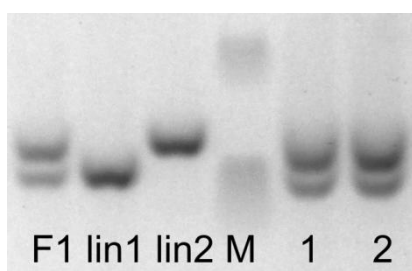
Tab. 6 Teplotní program PCR, v kroku 3 a 6: x - odpovídající teplota pro nasednutí primeru podle doporučení výrobce

krok	teplota (°C)	čas	poznámky
1	94	3 min	
2	94	45s	
3	x + 10	30s	v každém cyklu -1°C
4	72	30s	zpět na krok 2, a to 10x
5	94	30s	
6	x *	30s	
7	72	30s	zpět na krok 5, a to 25x
8	72	7 min	

*odpovídající teploty nasednutí primeru pro jednotlivé primery (Brass23 II = 49 °C, Brass25 II = 49 °C, Brass27 II = 41 °C, Brass29 II = 41 °C, Brass30 II = 45 °C, Brass32 II = 48 °C, Brass33 II = 44 °C, Brass36 II = 47 °C)

4.3.3 Vyhodnocení úspěšnosti primerů

Primery byly hodnoceny z hlediska schopnosti odlišit rodičovské linie a jejich potomky, F1 hybridy, při separaci na 2 % agarózovém gelu (viz obr. 7). Řazení vzorků na všech fotografiích bylo následující: F1 hybridní odrůda, rodičovská linie 1, rodičovská linie 2, hmotnostní a délkový standard 100 bp a následně vzorky testovaných odrůd. U každé z rodičovských linií byl očekávaný 1 PCR produkt o různých velikostech pro každého rodiče. U hybridního genotypu byly očekávány 2 PCR produkty (pruhy), velikostí odpovídající produktům u jednotlivých rodičovských linií.

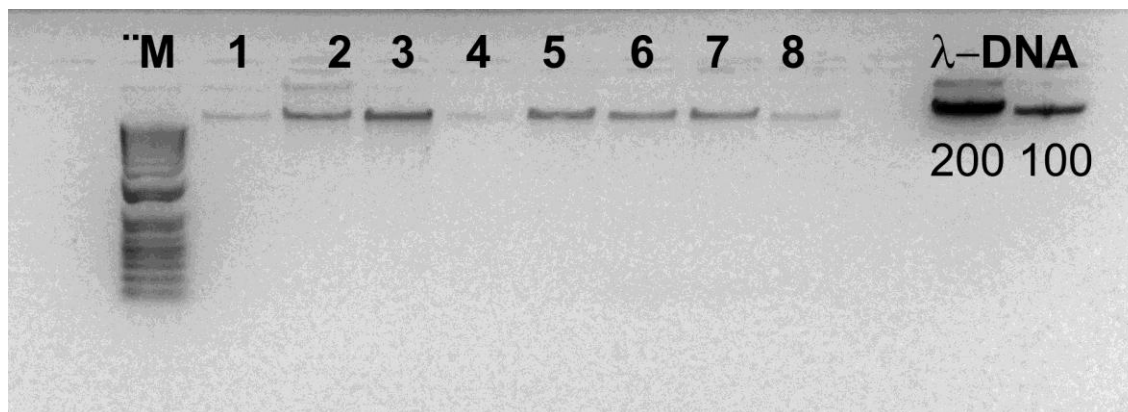


Obr.7 Příklad fragmentů získaných amplifikací SSR lokusu. Řazení vzorků je vždy: F1 hybridní odrůda, první rodič, druhý rodič, M - hmotnostní a molekulární standard (100bp), 1,2 - vzorky hybridního potomstva.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení čistoty a kvality DNA

Čistota a kvalita DNA po izolaci DNA z rostlinného materiálu byla stanovena elektroforetickou separací vzorků DNA na 0,8 % agarózovém gelu na horizontální elektroforéze ve srovnání se standardem λ -DNA o známé koncentraci (100 a 200 ng v 10 μ l).



Obr. 8 Kontrola kvality a koncentrace DNA na 0,8% agarózovém gelu: 1-8 vzorky DNA po izolaci, λ -DNA – standard (100 a 200 ng v 10 μ l), M – hmotnostní a délkový standard (100bp)

5.2 Analýza hybridních potomstev

Byla testována genetická čistota hybridního osiva tří vybraných odrůd zelí hlávkového a dále byly testovány primery, které dle výsledků skříňku F1 hybridů a jejich rodičovských linií provedeného na pracovišti Mendeleum v rámci výzkumného projektu, byly vybrány jako vhodné pro rozlišení rodičovských linií a jejich hybridů.

V této diplomové práci bylo testováno celkem osm párů SSR primerů u tří odrůd (9 genotypů vždy v trojkombinaci - jeden hybrid a dvě k němu odpovídající rodičovské linie) zelí hlávkového. Všechny osm primerů amplifikovalo produkty, ale pouze pět bylo schopných odlišit F1 hybridy a rodičovské linie. U odrůdy D - F1 byly testovány čtyři páry primerů a pouze dva z nich (Brass25 II a Brass32 II) produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně. Pomocí těchto primerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy D - F1 stanovena na 100 %. U odrůdy H - F1 byly testovány také čtyři páry primerů a pouze dva z nich (Brass29 II a Brass30 II) produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně. Pomocí těchto primerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy H - F1 stanovena na 98,57 %. U odrůdy T - F1 bylo testováno pět párů primerů a pouze tři z nich (Brass25 II,

Brass29 II a Brass33 II) produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně. Pomocí těchto primerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy T - F1 stanovena na 98,57 %.

Následující výsledky ukazují, zda se vhodnost sledovaných primerů potvrdila, či ne. Níže uvedené jsou výsledky primerů, u kterých se vhodnost potvrdila a byly schopny rozlišit rodičovské linie a jejich hybridy. V přílohách diplomové práce jsou výsledky primerů, které nejsou vhodné pro rozlišení rodičovských linií a jejich hybridů.

Tab. 7 Použité primery (+) a vhodné primery (++)

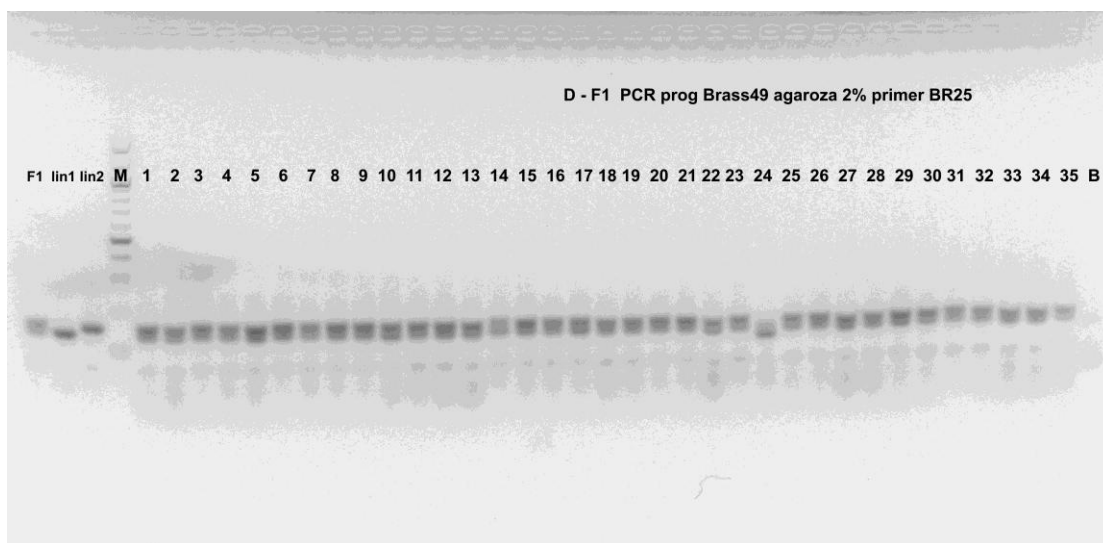
Číslo primeru	Primer	Odrůda, vzorek		
		D - F1 4, 5, 6	H - F1 1, 2, 3	T - F1 13, 14, 15
23	Brass23 II	+	+	
25	Brass25 II	++	+	++
27	Brass27 II	+		
29	Brass29 II		++	++
30	Brass30 II		++	
32	Brass32 II	++		+
33	Brass33 II			++
36	Brass36 II			+

5.2.1 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1

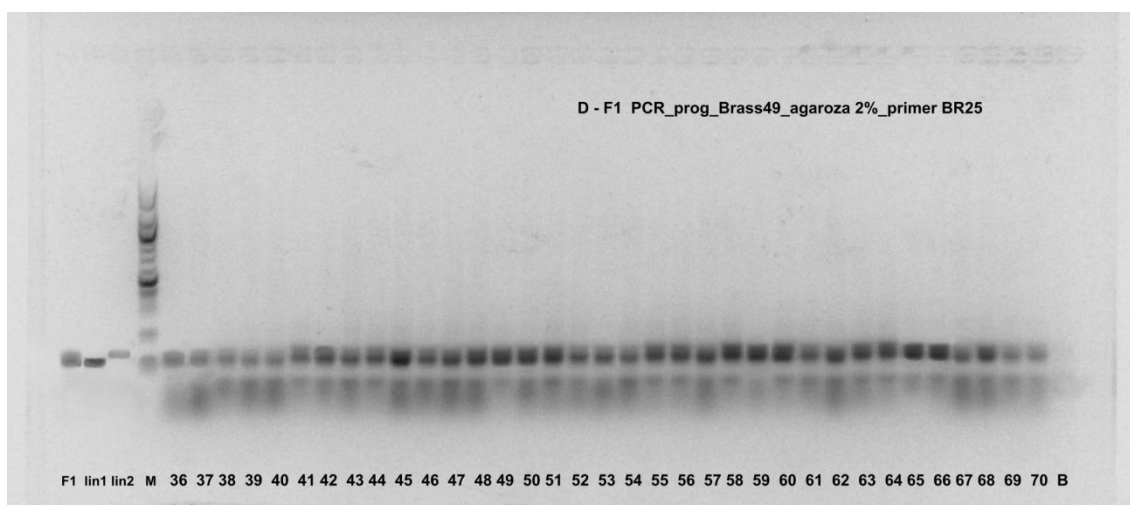
U hybridního potomstva osiva D - F1 byly podle skříninku provedeného v rámci výzkumného projektu na pracovišti Mendeleum doporučeny jako vhodné pro ověření čtyři SSR primery (Brass23 II, Brass25 II, Brass27 II a Brass32 II). Z těchto čtyř primerů se potvrdila vhodnost pouze u dvou - Brass25 II a Brass 32 II. Tyto dva primery produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně a byly proto schopny rozlišit F1 hybridy od rodičovských linií. Výsledky primerů Brass23 II a Brass27 II, u kterých nebyla potvrzena vhodnost pro rozlišení F1 hybridů a rodičovských linií jsou uvedeny v přílohách viz Obr. 23 - 26.

Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass25 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 9 a 10) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybrida jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 70) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Vzorek číslo 24 se jeví posunutý níže oproti ostatnímu hybridnímu potomstvu, což v tomto případě může být způsobeno disproporcí v gelu. Podle výše popsáných výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy D - F1 100 %.



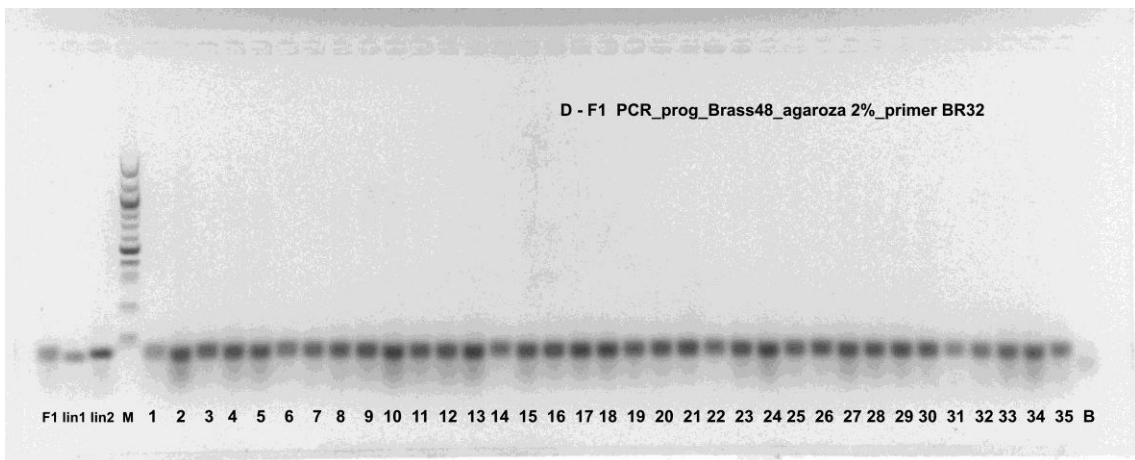
Obr. 9 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass25 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



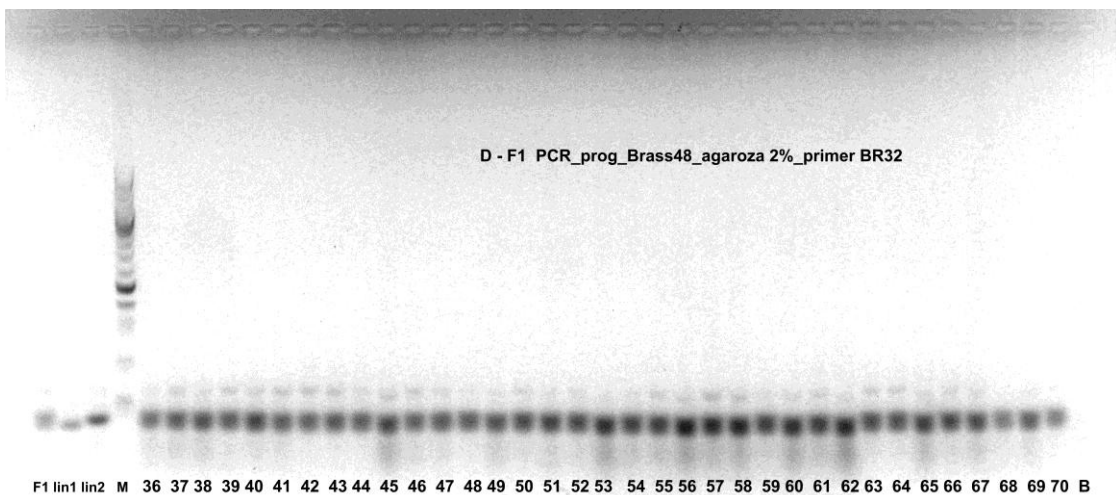
Obr. 10 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass25 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass32 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 11 a 12) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybridu jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 70) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Podle výše popsaných výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy D - F1 100 %.



Obr. 11 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass32 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



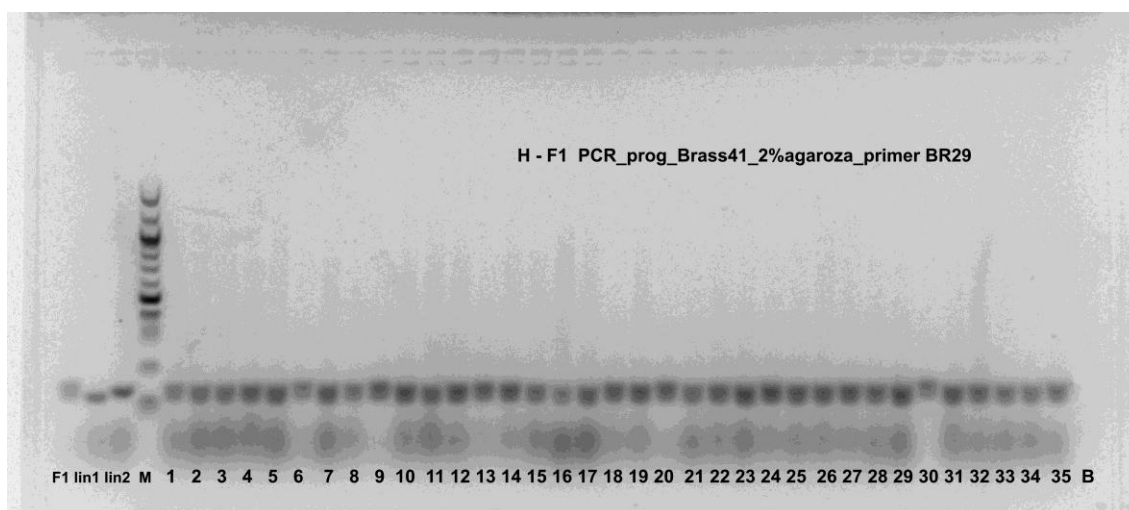
Obr. 12 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass32 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

5.2.2 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1

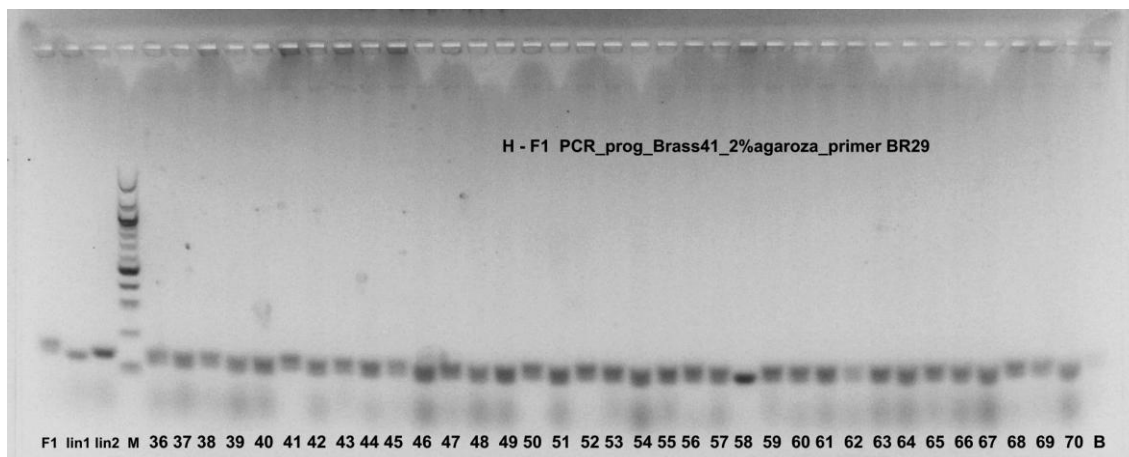
U hybridního potomstva osiva H - F1 byly podle skríninku provedeného v rámci výzkumného projektu na pracovišti Mendeleum doporučeny jako vhodné čtyři primery (Brass23 II, Brass25 II, Brass29 II a Brass30 II). Z těchto čtyř primerů se potvrdila vhodnost pouze dvou - Brass29 II a Brass 30 II. Tyto dva primery produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně a byly proto schopny rozlišit F1 hybridy od rodičovských linií. Výsledky primerů Brass23 II a Brass25 II, u kterých nebyla potvrzena vhodnost pro rozlišení F1 hybridů a rodičovských linií jsou uvedeny v přílohách viz Obr. 27 - 30.

Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass 29 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 13 a 14) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybrida jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 57, 59 - 70) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Vzorek číslo 58 ukazuje pouze pruh od rodičovské linie 1, což znamená, že se nejedná o hetezygota. Podle výše popsaných výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy H - F1 98,57 %.



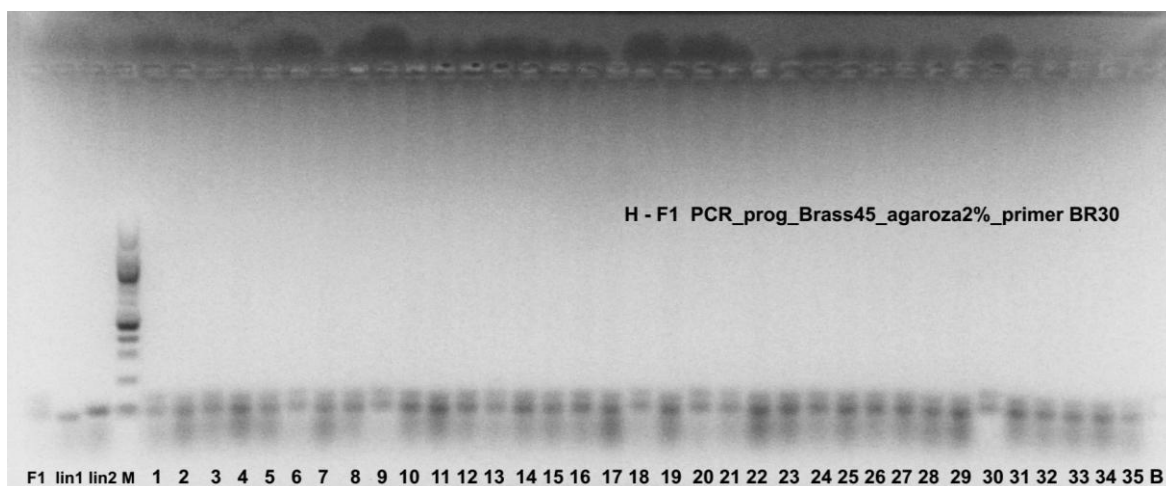
Obr. 13 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass29 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



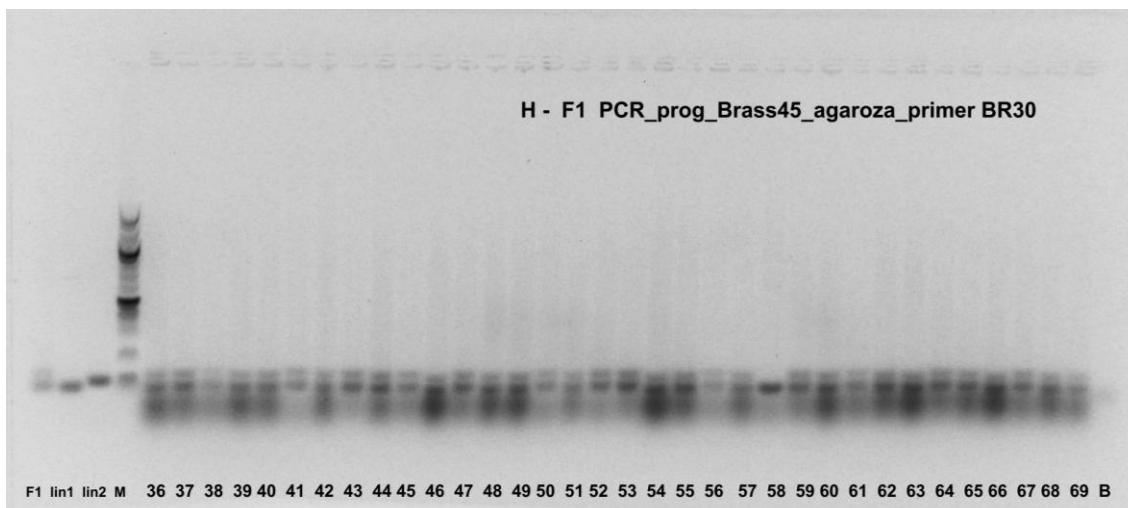
Obr. 14 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass29 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass 30 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 15 a 16) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybrida jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 57, 59 - 69) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Vzorek číslo 58 ukazuje pouze pruh od rodičovské linie 1, což znamená, že se nejedná o heterozygota. Podle výše popsaných výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy H - F1 98,57 %.



Obr. 15 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass30 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



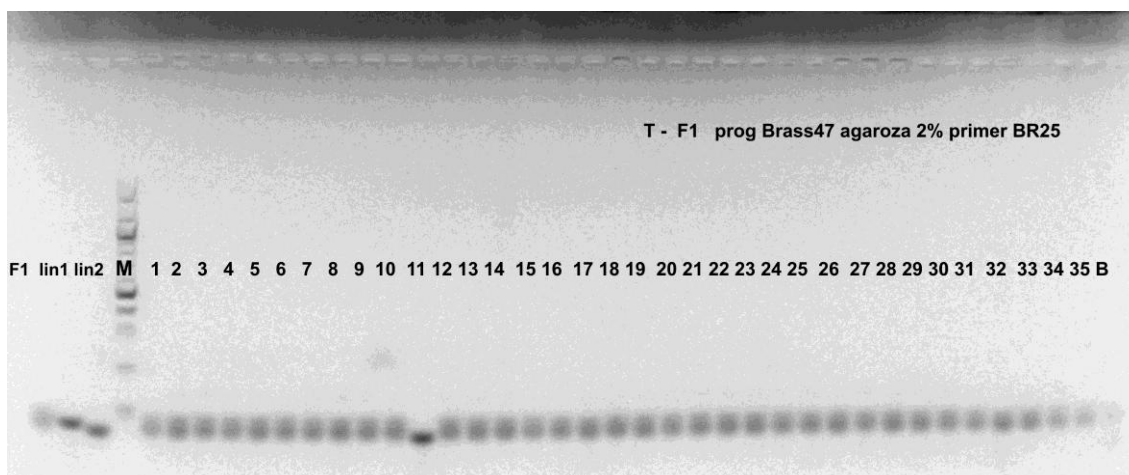
Obr. 16 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass30 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 69 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

5.2.3 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1

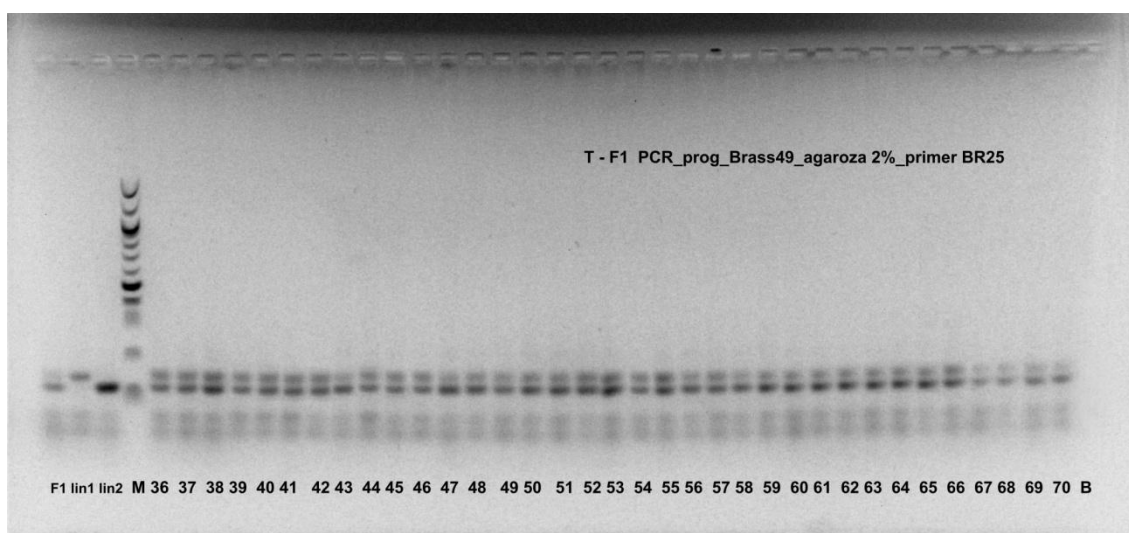
U hybridního potomstva osiva T - F1 bylo podle skríninku provedeného v rámci výzkumného projektu na pracovišti Mendeleum doporučeno jako vhodné pět primerů (Brass25 II, Brass29 II, Brass32 II, Brass33 II a Brass36 II). Z těchto pěti primerů se potvrdila vhodnost pouze tří - Brass25 II, Brass29 II a Brass33 II. Tyto tři primery produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně a byly proto schopny rozlišit F1 hybridy od rodičovských linií. Výsledky primerů Brass32 II a Brass36 II, u kterých nebyla potvrzena vhodnost pro rozlišení F1 hybridů a rodičovských linií jsou uvedeny v přílohách viz Obr. 31 - 34.

Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass 25 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 17 a 18) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybrida jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 10, 12 - 70) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Vzorek číslo 11 ukazuje pouze pruh od rodičovské linie 2, což znamená, že se nejedná o heterozygota. Podle výše popsaných výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy T - F1 98,57 %.



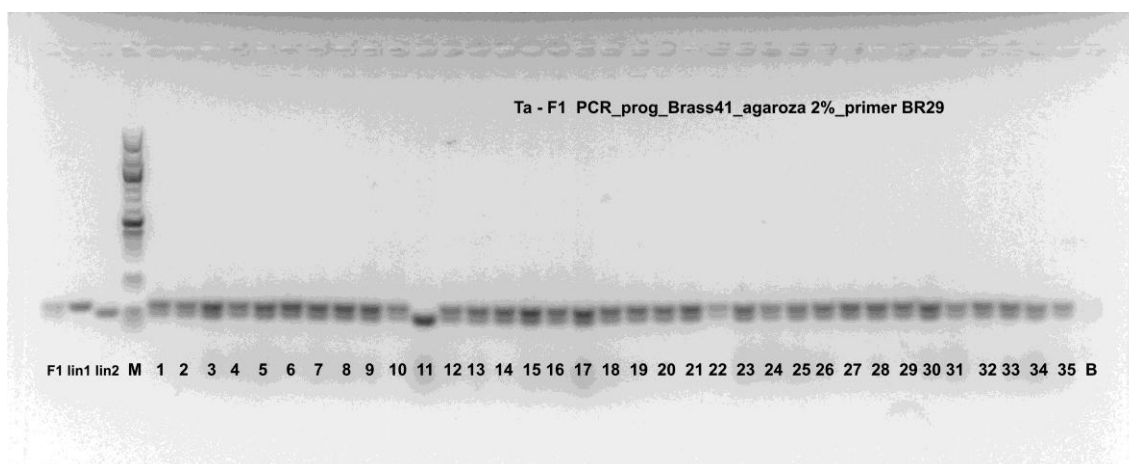
Obr. 17 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass25 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



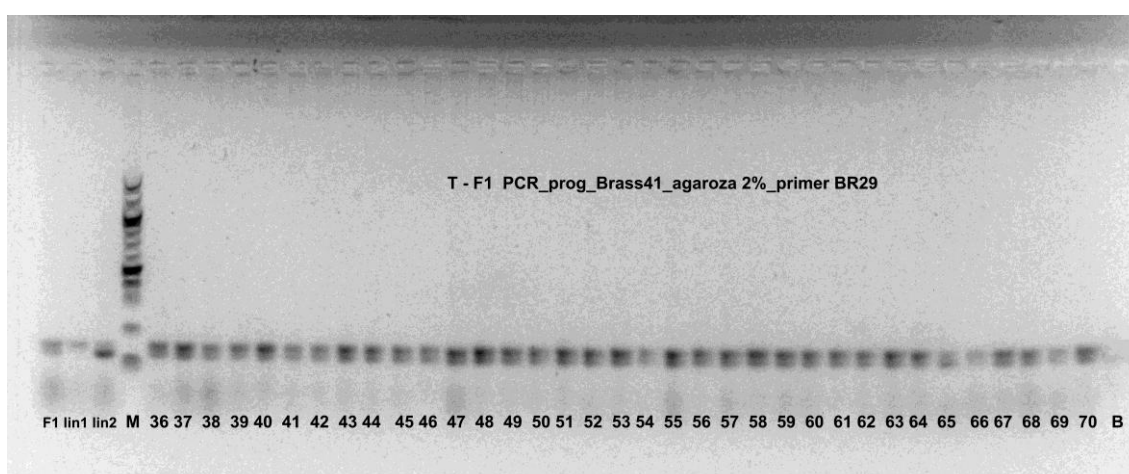
Obr. 18 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass25 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass 29 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 19 a 20) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybridu jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 10, 12 - 70) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Vzorek číslo 11 ukazuje pouze pruh od rodičovské linie 2, což znamená, že se nejedná o heterozygota. Podle výše popsanych výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy T - F1 98,57 %.



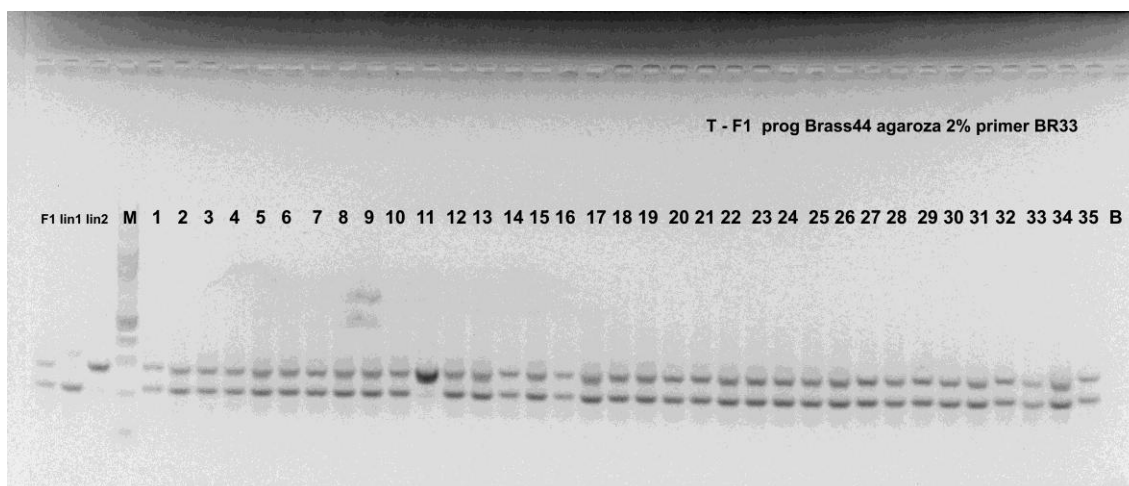
Obr. 19 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass29 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



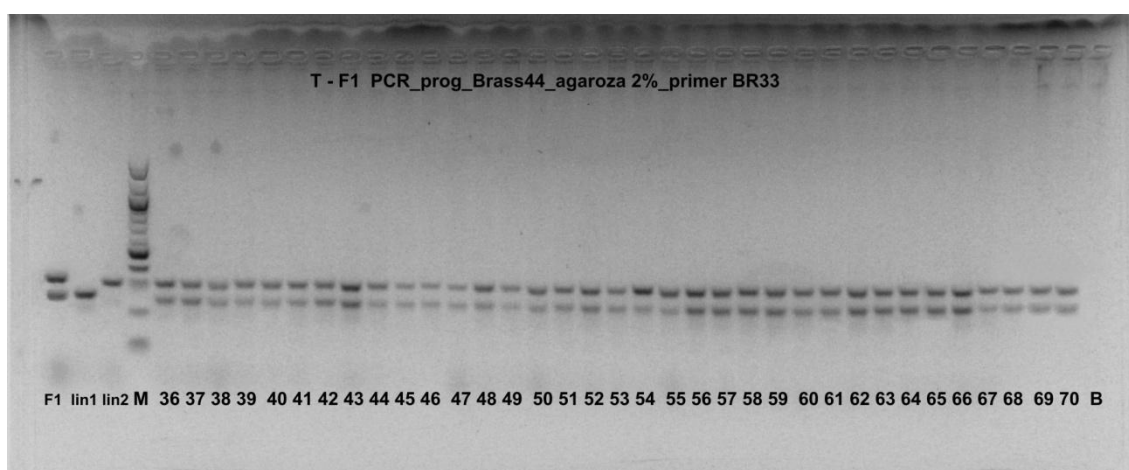
Obr. 20 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass29 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass 33 II

Na obrázcích agarózového gelu po elektroforéze (Obr. 21 a 22) jsou jasně vidět u rodičovských linií (lin1 a lin2) jednotlivé pruhy znázorňující homozygota pro tento mikrosatelitní lokus, u F1 hybrida jsou vidět oba rodičovské pruhy, což vypovídá o tom, že se jedná o heterozygota pocházejícího z tohoto křížení. Výsledné potomstvo (vzorky 1 - 10, 12 - 70) má oba dva pruhy, z čehož vyplývá, že se jedná o heterozygotní hybridy. Vzorek číslo 11 ukazuje pouze pruh od rodičovské linie 2, což znamená, že se nejedná o heterozygota. Podle výše popsaných výsledků je tedy genetická čistota hybridního osiva odrůdy T - F1 98,57 %.



Obr. 21 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass33 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



Obr. 22 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass33 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

5.3 Hodnocení genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového

Díky vybraným vhodným primerům a jejich schopnosti rozlišení F1 hybridů a rodičovských linií, bylo možné stanovit genetickou čistotu testovaného hybridního osiva u tří vybraných odrůd zelí hlávkového. U odrůdy D - F1 se vyskytovali pouze jedinci, kteří produkovali současně markery obou rodičovských rostlin (genotypů), a tak byla genická čistota tohoto hybridního osiva stanovena jako 100 %. Mezi testovanými jedinci odrůd H - F1 a T - F1 se vyskytnul vždy jeden jedinec, který produkoval pouze marker jedné z rodičovských linií, a proto byla genetická čistota hybridního osiva těchto dvou odrůd stanovena na 98,57 %.

6 DISKUZE

SSR markery jsou v současné době výhodnými molekulárními markery pro identifikaci genetické čistoty u mnoha plodin vzhledem ke své vysoké účinnosti a jednoduchosti. Pravost hybrida je jednou z nejdůležitějších vlastností kvalitního osiva. Je proto důležité, aby dodavatelé osiv kontrolovali genetickou čistotu osiva před uvedením na trh.

V literatuře je popsáno několik studií testování genetické čistoty hybridního osiva a SSR markerů pro rozlišení F1 hybridních rostlin u zelí a jiných plodin. Sudharani *et al.* (2014) identifikovali SSR markery pro testování hybridnosti a genetické čistoty osiva u kukuřice (*Zea mays* L.). Mezi 12 testovanými mikrosatelitními markery, byly dva schopny vytvářet komplementární pruhy mezi hybridem DHM-117 a jeho odpovídajícími rodičovskými samičími a samčími liniemi. Bylo zjištěno, že hybridní kukuřice DHM-117 se zřetelně liší od svých rodičovských linií. Testování genetické čistoty čtyřiceti náhodně vybraných hybridních rostlin DHM-117 ve dvou sadách po dvaceti s vybraným markerem ukázala 100 % čistotu u vybraných rostlin v první sadě, avšak ve druhé sadě se ukázalo pět rostlin jako nehybridní rostliny. Další studie zabývající se genetickou čistotou osiva a SSR markery byly provedeny např. u slunečnice (Pallavi *et al.*, 2011), manioku (Mohan *et al.*, 2013), sóji (Zhang *et al.*, 2014) a rajčat (Liu *et al.*, 2008).

Ye *et al.* (2013) testovali genetickou čistotu osiva zelí F1 hybridní odrůdy 'Sugan 21' pomocí molekulárních markerů založených na PCR včetně SSR. Z celkového počtu 325 primerů bylo testováno 85 SSR primerů, z nichž tři kombinace primerů dokázaly produkovat u F1 hybridů současně markery FPS (female parent-specific = specifické pro samičího rodiče) i MPS (male parent-specific = specifické pro samčího rodiče). Testování 216 F1 hybridních rostlin ukázalo, že tři rostliny produkovaly pouze FPS markery a jedna pouze MPS markery, zbylých 212 hybridních jedinců produkovalo jak FPS, tak i MPS markery a genetická čistota F1 hybridních semen byla proto stanovena na 98,15 %.

Liu *et al.* (2007) použili čtyři molekulární markerové systémy pro hodnocení genetické čistoty hybridního osiva kultivaru zelí 'Zaoxia 16'. Genetické vztahy F1 hybridů a jejich rodičů byly analyzovány pomocí 339 primerů, z toho 44 SSR primerů. Z vybraných SSR primerů pouze dva produkovaly zároveň FPS i MPS

markery a byly vybrány pro testování genetické čistoty hybridního osiva. 210 hybridních rostlin 'Zaoxia 16' bylo podrobena skříninku s vybranými dvěma primery a genetická čistota byla stanovena na 94,8 %.

V této diplomové práci bylo testováno celkem osm párů SSR primerů u tří odrůd (9 genotypů vždy v trojkombinaci - hybrid a k němu odpovídající rodičovské linie) zelí hlávkového. Všechny osm primerů amplifikovalo produkty, ale pouze pět bylo schopných odlišit F1 hybridy a rodičovské linie. U odrůdy D - F1 byly testovány čtyři páry primerů a pouze dva z nich (Brass25 II a Brass32 II) produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně. Pomocí těchto markerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy D - F1 stanovena na 100 %. U odrůdy H - F1 byly testovány také čtyři páry primerů a pouze dva z nich (Brass29 II a Brass30 II) produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně. Pomocí těchto markerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy H - F1 stanovena na 98,57 %. U odrůdy T - F1 bylo testováno pět párů primerů a pouze tři z nich (Brass25 II, Brass29 II a Brass33 II) produkovaly markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně. Pomocí těchto markerů byla genetická čistota hybridního osiva odrůdy T - F1 stanovena na 98,57 %.

Žádný z testovaných primerů neprodukoval markery obou rodičovských rostlin u F1 hybridů současně u všech odrůd. Primer Brass25 II byl schopný rozlišit F1 hybridy od rodičovských linií u dvou odrůd D - F1 a T - F1, stejně tak jako primer Brass29 II u odrůd H - F1 a T - F1.

Amplifikované produkty PCR byly při analýzách vždy separovány na 2 % agarózovém gelu. Výrobci a dodavatelé nabízí také typy agaróz se zvýšenou separační schopností, např. agarózu MetaPhor (výrobce BMA Products), která má schopnost rozlišit produkty po PCR vzdálené od sebe pouze 2 bp. Analýza s touto agarózou byla pracnější a finančně náročnější, i když výsledky by byly přesnější. Je tedy na zvážení, který typ agarózy používat.

Výsledky této diplomové práce mohou být komerční firmou použity v praxi pro testování genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového před uvedením na trh.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala testováním genetické čistoty hybridního osiva tří odrůd zelí hlávkového (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Dále byla testována vhodnost SSR primerů vybraných dle předešlého skříninku provedeného v rámci výzkumného projektu na pracovišti Mendeleum. Ne u všech primerů se tato vhodnost potvrdila.

V této práci byla tedy testována použitelnost vybraných SSR primerů pro rozlišení rodičovských linií od jejich hybridního potomstva u tří odrůd zelí hlávkového. Výsledkem těchto testů bylo určení dvou vhodných primerů pro odrůdy D - F1 a H - F1 a tří vhodných primerů pro odrůdu T - F1.

Genetická čistota byla vypočítána na 100 % u odrůdy D - F1, 98,57 % u odrůdy H - F1 a stejně tak 98,57 % u odrůdy T - F1.

Výsledky této práce mají potenciál využití v praxi komerční firmou, která poskytla vzorky osiva pro testování. Před uvedením hybridního osiva na trh je vhodné provést kontrolu jeho genetické čistoty.

8 SOUHRN A RESUME

Testování genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového pomocí molekulárních metod

Literární část diplomové práce je věnována zelí hlávkovému obecně, jeho historii a botanickému popisu. Dále popisuje molekulární metodu PCR a metody založené na PCR, kterými jsou RAPD, AFLP a SSR. Praktická část se zabývá testováním genetické čistoty hybridního osiva zelí hlávkového a testováním vhodnosti vybraných SSR primerů. Bylo nalezeno pět SSR primerů, které jsou schopny rozlišit hybridní potomstvo a jejich odpovídající rodičovské linie, jejichž křížením vznikly. Za použití těchto primerů byla stanovena genetická čistota hybridního osiva u tří odrůd zelí hlávkového. Výsledky této práce mají potenciál využití v praxi komerční firmou, která poskytla vzorky osiva pro testování.

Klíčová slova: Zelí, molekulární metody, SSR, F1 hybrid, genetická čistota

Testing of hybrid seeds genetic purity in head cabbage by molecular methods

The literary part of the diploma thesis is devoted to head cabbage in general, its history and botanical description. It also describes molecular method PCR and methods based on PCR, which are RAPD, AFLP and SSR. The practical part of the thesis is focused on testing of hybrid seeds genetic purity in head cabbage and testing of suitability of selected SSR primers. Five SSR primers were found to be able to differentiate hybrid offspring and its corresponding parental lines, by which crossbreeding they originated. Hybrid seeds genetic purity in three varieties of head cabbage was determined by these primers. The results of this thesis have the potential to be used in practice by a commercial company that has provided the seed samples for testing.

Keywords: Cabbage, molecular methods, SSR, F1 hybrid, genetic purity

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ARNHEIM, N. a H ERLICH. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1992, roč. 61, s. 131–156 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.61.070192.001023?journalCode=biochem>

BALKAYA, A., R. YANMAZ, A. APAYDIN a H. KAR. Morphological characterisation of white head cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata subvar. alba) genotypes in Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* [online]. 2005, roč. 33, č. 4, s. 333–341 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01140671.2005.9514367>

BARÁNEK, M., K. MORAVCOVÁ a M. PIDRA. *Biotechnologie v zahradnictví (návody pro praktická laboratorní cvičení)*. 1. vyd. Brno: Ediční středisko MZLU, 2006. ISBN 80-7157-937-8.

BECKMANN, J. S. a J. L. WEBER. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* [online]. 1992, roč. 12, č. 4, s. 627–631 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/088875439290285Z>

BIONINJA. PCR [online]. 2016 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>

BRIMEYER, T. ForefrontHeath. *3 Reasons Broccoli May Be Dangerous To Your Thyroid* [online]. 2016 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.forefronthhealth.com/cruciferous-vegetables-thyroid/>

BUCHTOVÁ, I. *Situační a výhledová zpráv - zelenina* [online]. 2015 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/zemedelstvi/publikace-a-dokumenty/situacni-a-vyhledove-zpravy/roslinne-komodity/zelenina/>

CONDIT, R. a S.P. HUBBELL. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* [online]. 1991, roč. 34, č. 1, s. 66–71 [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g91-011?journalCode=gen#.WCNdKjrrvug>

DELSENY, M., M. LAROCHE a P. PENON. Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1983, roč. 116, č. 1, s. 113–120 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X83903881>

DEMEKE, T., R. P. ADAMS a R. CHIBBAR. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 1992, roč. 84, č. 7, s. 990–994 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00227415>

DIXON, G. R. *Vegetable Brassicas and Related Crucifers. Crop Production Science in Horticulture 14* [online]. 2007 [cit. 2017-02-26]. Cambridge, MA 02139 USA: CABI. ISBN 9780851993959. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15228860801890774?scroll=top&needAccess=true>

- EL-ESAWI, M. A., K. GERMAINE, P. BOURKE a R. MALONE. Genetic diversity and population structure of Brassica oleracea germplasm in Ireland using SSR markers. *Comptes rendus - Biologies* [online]. 2016, roč. 339, č. 3–4, s. 133–140 [cit. 2017-02-26]. ISSN 1631-0691. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069116000251>
- FALTUSOVÁ, Z., L. KUČERA a J. OVESNÁ. Genetic diversity of Brassica oleracea var . capitata gene bank accessions assessed by AFLP. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2011, roč. 14, č. 1995 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582011000300011&script=sci_arttext
- FAOSTAT. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [online]. 2017 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- GARCIA, A. A. F., L. L. BENCHIMOL, A. M. M. BARBOSA, I. O. GERALDI, C. L. SOUZA Jr. a A. P. DE SOUZA. Comparison of RAPD , RFLP , AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines [online]. 2004, roč. 588, s. 579–588 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572004000400019
- GENET, T., C. D. VILJOEN a M. T. LABUSCHAGNE. Genetic analysis of Ethiopian mustard genotypes using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2005, roč. 4, č. September, s. 891–897 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/71127>
- HOSHINO, A. A., J. P. BRAVO, P. M. NOBILE a K. A. MORELLI. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis [online]. 1999 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/28891.pdf>
- CHANIN, S. A Quasi-brief History of Mustard, the “Triangle of U,” and Your Favorite Veggies In: *SaveTheBay Blog* [online]. 13. 2. 2013 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <https://blog.savesfbay.org/2013/02/a-quasi-brief-history-of-mustard-the-triangle-of-u-and-your-favorite-veggies/>
- CHENG, F., J. WU a X. WANG. Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. *Horticulture Research* [online]. 2014, roč. 1, s. 1–8 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/hortres201424>
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* [online]. 2005, roč. 436, August, s. 793–800 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v436/n7052/abs/nature03895.html>
- JARNE, P. a P. J. L. LAGODA. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. 1996, roč. 11, č. 10, s. 424–429 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169534796100495>
- JOSHI, M. a J. D. DESHPANDE. Polymerase Chain Reaction : Methods, Principles and application. *International Journal of Biomedical Research* [online]. 2011, roč. 2, č. 1, s. 81–97 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://www.ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>

- KALIA, R. K., M. K. RAI, S. KALIA, R. SINGH a A. K. DHAWAN. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* [online]. 2001, roč. 177, May 2014, s. 309–334 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10681-010-0286-9>
- KATTI, M. V., P. K. RANJEKAR a V. S. GUPTA. Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences. *Molecular Biology Evolution* [online]. 2001, roč. 18, č. 7, s. 1161–1167 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: http://bioinformaticauf.crg.cat/2004/projectes04/3.9.1/Katti_2001.pdf
- KENG, H. Economic Plants of Ancient North China as Mentioned in „Shih Ching“ (Book of Poetry). *Economic Botany* [online]. 1974, roč. 28, č. 4, s. 391–410 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/4253534>
- KLIMYUK, V. I., B. J. CARROLL, C. M. THOMAS a J. D. G. JONES. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *The Plant Journal* [online]. 1993, roč. 3, s. 493–494 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00169.x/full>
- KUMAR, N. S. a G. GURUSUBRAMANIAN. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications [online]. 2001, roč. 11, č. 3, s. 116–124 [cit. 2017-01-16]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.404.1046&rep=rep1&type=pdf>
- KUMARI, N. a S. K. THAKUR. Randomly Amplified Polymorphic DNA - A Brief Review [online]. 2014, roč. 9, č. 1, s. 6–13 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://thescipub.com/PDF/ajavsp.2014.6.13.pdf>
- LAURENTIN, H. E. a P. KARLOVSKY. Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length. *BMC Genetics* [online]. 2006, roč. 10, s. 1–10 [cit. 2017-01-16]. Dostupné z: <http://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-7-10>
- LIU, L., G. LIU, Y. GONG, Y. WANG, W. DAI, Y. WANG, F. YU a Y. REN. Evaluation of Genetic Purity of F1 Hybrid Seeds in Cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR Markers. *HortScience* [online]. 2007, roč. 42, č. 3, s. 724–727 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://hortsci.ashspublishings.org/content/42/3/724.short>
- LIU, L., Y. WANG, Y. GONG, X. ZHAI, F. YU a H. SHEN. Genetic Purity Test of F1 Hybrid Tomato Using Molecular Marker Analysis. *Acta Horticulturae (ISHS)* [online]. 2008, roč. 771, s. 231–238 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=771_34
- LORENZ, O. A. a D. N. MAYNARD. *Knott's handbook for vegetable growers*. 3. vyd. New York: John Wiley & Sons, 1988. ISBN 0471852406.
- LOUARN, S., A. M. TORP, I. B. HOLME, S. B. ANDERSEN a B. D. JENSEN. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in Brassica oleracea. *Genetic Resources and Crop Evolution* [online]. 2007, roč. 54, č. 8, s. 1717–1725 [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10722-006-9181-6>

- LOVE, Ch. G., J. BATLEY, G. LIM, A. J. ROBINSON, D. SAVAGE, D. SINGH, G. C. SPANGENBERG a D. EDWARDS. New computational tools for Brassica genome research. *Comparative and Functional Genomics* [online]. 2004, roč. 5, s. 276–280 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cfg.394/epdf>
- MARCOTTE, E. M., M. PELLEGRINI, T. O. YEATES a D. EISENBERG. A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1999, roč. 293, č. 1, s. 151–160 [cit. 2016-11-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699931364>
- MOHAN, C., P. SHANMUGASUNDARAM a N. SENTHIL. Identification of True Hybrid Progenies in Cassava Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Bangladesh Journal of Botany* [online]. 20013, roč. 42, č. 1, s. 155–159 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.banglajol.info/index.php/BJB/article/view/15906>
- PALLAVI, H. M., R. GOWDA, Y. G. SHADAKSHARI, K. BHANUPRAKASH a K. VISHWANATH. Identification of SSR Markers for Hybridity and Seed Genetic Purity Testing in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* [online]. 2011, roč. 34, č. 54, s. 59–66 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/helia.2011.34.issue-54/hel1154059p/hel1154059p.xml>
- PARK, Y., J. K. LEE a N. KIM. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops. *Molecules* [online]. 2009, roč. 14, č. 11, s. 4546–4569 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: www.mdpi.com/1420-3049/14/11/4546/pdf
- PASSALACQUA, N. G., P. M. GUARRERA a G. DE FINE. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia* [online]. 2007, roč. 78, č. 1, s. 52–68 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X06002139>
- PETŘÍKOVÁ, K. a J. HLUŠEK. *Zelenina*. Praha: ProfiPress, 2012. ISBN 978-80-86726-50-2.
- POLÍVKA, F. *Názorná květena zemí koruny české sv. II* [online]. 1900 [cit. 2017-02-16]. Olomouc: R. Promberger. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kvetena/kvetena.php?dil=2&page=113>
- POWELL, W., M. MORGANTE, C. ANDRE, M. HANAFEY, J. VOGEL, S. TINGEY a A. RAFALSKI. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* [online]. 1996, roč. 2, č. 3, s. 225–238 [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00564200>
- PRAKASH, S. a K. HINATA. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop brassicas, a review. *Opera Botanica* [online]. 1980, č. 55, s. 1–57 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19811695217>
- RÖBBELEN, G. Contributions to the analysis of the Brassicagenome. *Chromosoma* [online]. 1960, roč. 11, s. 205–228 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00328652>

- ROSA, E. A. S., R. K. HEANEY, G. R. FENWICK a C. A. M. PORTAS. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* [online]. 1997, roč. 19, s. 99–215 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=jdVY1nF_BjkC&oi=fnd&pg=PA99&dq=Glucosinolates+in+crop+plants+1997&ots=_PY_eYH0Cq&sig=D8KUzHknOLkor6Uwpv8Jzd5q2lA&redir_esc=y#v=onepage&q=Glucosinolates in crop plants 1997&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=jdVY1nF_BjkC&oi=fnd&pg=PA99&dq=Glucosinolates+in+crop+plants+1997&ots=_PY_eYH0Cq&sig=D8KUzHknOLkor6Uwpv8Jzd5q2lA&redir_esc=y#v=onepage&q=Glucosinolates+in+crop+plants+1997&f=false)
- ROSYPAL, S., J. DOŠKÁŘ, K. PETRZIK a V. RŮŽIČKOVÁ. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000. ISBN 80-902562-4-4.
- ROSYPAL, S a KOLEKTIV. *Terminologie molekulární biologie: české odborné termíny, jejich definice a anglické ekvivalenty*. 1. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2001. ISBN 80-902562-3-6.
- RUBATZKY, V. E. a M. YAMAGUCHI. *World vegetables: principles, production, and nutritive values* [online]. 2. vyd. New York: Chapman & Hall, 1997 [cit. 2017-02-26]. ISBN 0412112213. Dostupné z: <http://www.springer.com/gp/book/9781461377566>
- SAIKI, R. K, D. H GELFAND, S STOFFEL, S. J SCHARF, R HIGUCHI, G. T HORN, K. B MULLIS a H. ERLICH. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1988, roč. 29, č. 239(4839), s. 487–91 [cit. 2017-01-16]. Dostupné z: https://www.mun.ca/biology/scarr/Saiki,_Mullis_et_al_1988_Science_239,487.pdf
- SAMBROOK, J., E.F. FRITCH a T. MANIATIS. *Molecular Cloning- a laboratory manual*. second. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6.
- SCOTT, K. D., P. EGGLER, G. SEATON, M. ROSSETTO, E. M. ABLETT, L. S. LEE a R. J. HENRY. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 2000, roč. 100, č. 5, s. 723–726 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s001220051344>
- SNOGERUP, S. The wild forms of the Brassica oleracea group (2n = 18) and their possible relations to the cultivated ones. *Biology and breeding* [online]. 1980, s. 121–132 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801689308>
- SOCHOROVÁ, J. *Ověřování SSR markerů vhodných pro rozlišování odrůd vybraných zelenin z čeledi Brassicaceae* [online]. 2014 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://is.mendelu.cz/zp/index.pl?podrobnosti=55643;lang=en>
- SONG, K., K. TANG, T. C. OSBORN a P. LU. Genome Variation and Evolution of Brassica Amphidiploids. *Acta Horticulturae* [online]. 1996, roč. 407, s. 35–44 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: http://www.actahort.org/books/407/407_2.htm
- SUDHARANI, M., P. S. RAO a L. V. SUBBA RAO. Identification of SSR Markers for Testing of Hybridity and Seed Genetic Purity in Maize (*Zea Mays* L.). *International Journal of Science and Research* [online]. 2014, roč. 3, č. 10, s. 92–95 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <https://www.ijsr.net/archive/v3i10/T0NUMTQ0.pdf>

- ŠAMEC, D., I. PAVLOVIC a B. SALOPEK-SONDI. White cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews* [online]. 2016, roč. 16, č. 1, s. 117–135 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11101-016-9454-4>
- TAUTZ, D. a M. RENZ. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* [online]. 1984, roč. 12, č. 10, s. 4127–4138 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/12/10/4127/1137852/Simple-sequences-are-ubiquitous-repetitive>
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* [online]. 2000, roč. 408, December, s. 796–815 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/full/408796a0.html>
- U, N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 1935, roč. 7, s. 389–452.
- ÚKZÚZ. *Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2016* [online]. 2016 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/informace-o-odrudach/odrudy-registrovane-v-cr/seznam-odrud/>
- VAN HINTUM, T. J. L., C. C. M. VAN DE WIEL, D. L. VISSER, R. VAN TREUREN a B. VOSMAN. The distribution of genetic diversity in a *Brassica oleracea* gene bank collection related to the effects on diversity of regeneration, as measured with AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 2007, roč. 114, č. 5, s. 777–786 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00122-006-0456-2>
- VILLALOBOS-BARRANTES, H. M., E. G. GARCÍA, A. J. LOWE a F. J. ALBERTAZZI, 2015. Genetic analysis of the dry forest timber tree *Sideroxylon capiri* in Costa Rica using AFLP. *Plant Syst. Evol.* [online]. 2015, roč. 301, s. 15–23 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00606-014-1049-1>
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN a M. KUIPER. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* [online]. 1995, roč. 23, č. 21, s. 4407–4414 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501463>
- WANG, F., F. LI, J. WANG, Y. ZHOU a H. SUN. Genetic Diversity of the Selected 64 Potato Germplasm Revealed by AFLP Markers. *Molecular Plant Breeding* [online]. 2011, roč. 2, č. 4, s. 22–29 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: <http://biopublisher.ca/index.php/mpb/article/view/132>
- WANG, M. L., N. A. BARKLEY a T. M. JENKINS. Microsatellite Markers in Plants and Insects . Part I: Applications of Biotechnology. *Genes, Genomes and Genomics* [online]. 2009, roč. 3, Special Issue I, s. 54–67 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/83ef/e405d89859570ff79ebb44cd2e3fff5a562f.pdf>

WANG, Z. J. L. WEBER, G. ZHONG a S. D. TANKSLEY. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 1994, roč. 88, č. 1, s. 1–6 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00222386?LI=true>

WELSH, J. a M. MCCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research* [online]. 1990, roč. 18, č. 24, s. 7213–7218 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/18.24.7213>

WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI a S. V. TINGEY. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* [online]. 1990, roč. 18, č. 22, s. 6531–6535 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/21177169_DNA_polymorphisms_amplified_by_arbitraryprimers_are_useful_as_genetic_markers

WINK, M. Importance of the Polymerase Chain Reaction (PCR) for Plant Science. *BIOforum Extra* [online]. 1994 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <https://www.uni-heidelberg.de/institute/fak14/ipmb/phazb/pubwink/1994/11.%201994.pdf>

YE, S., Y. WANG, D. HUANG, J. LI, Y. GONG, L. XU a L. LIU. Genetic purity testing of F1 hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Scientia Horticulturae* [online]. 2013, roč. 155, s. 92–96 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423813001301>

ZHANG, C. B., B. PENG, W. L. ZHANG, S. M. WANG, H. SUN, Y. S. DONG a L. M. ZHAO. Application of SSR Markers for Purity Testing of Commercial Hybrid Soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology* [online]. 2014, roč. 16, č. 6, s. 1389–1396 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: http://jast.modares.ac.ir/article_11663_0.html

10 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Obr. 23 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass23 II - 1. sada

Obr. 24 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass23 II - 2. sada

Obr. 25 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass27 II - 1. sada

Obr. 26 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass27 II - 2. sada

Obr. 27 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass23 II - 1. sada

Obr. 28 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass23 II - 2. sada

Obr. 29 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass25 II - 1. sada

Obr. 30 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass25 II - 2. sada

Obr. 31 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass32 II - 1. sada

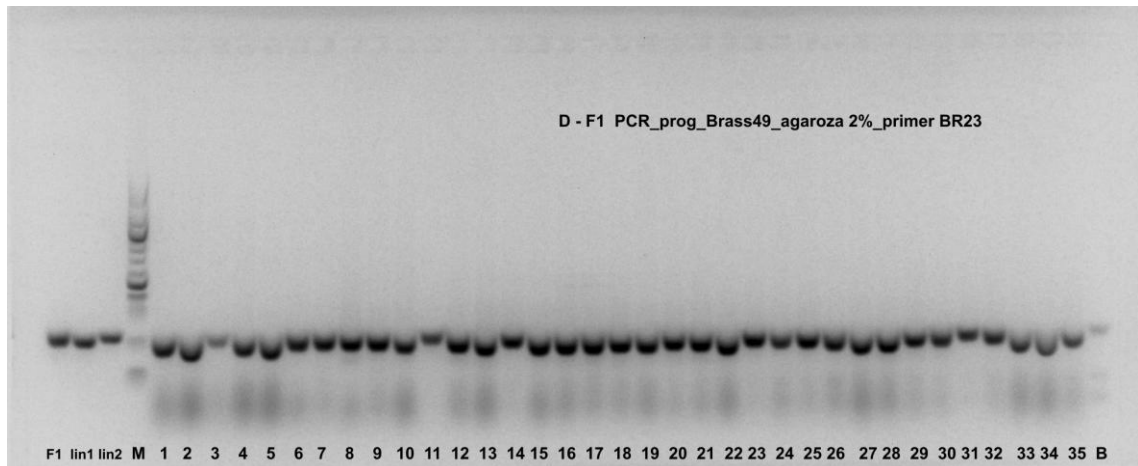
Obr. 32 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass32 II - 2. sada

Obr. 33 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass36 II - 1. sada

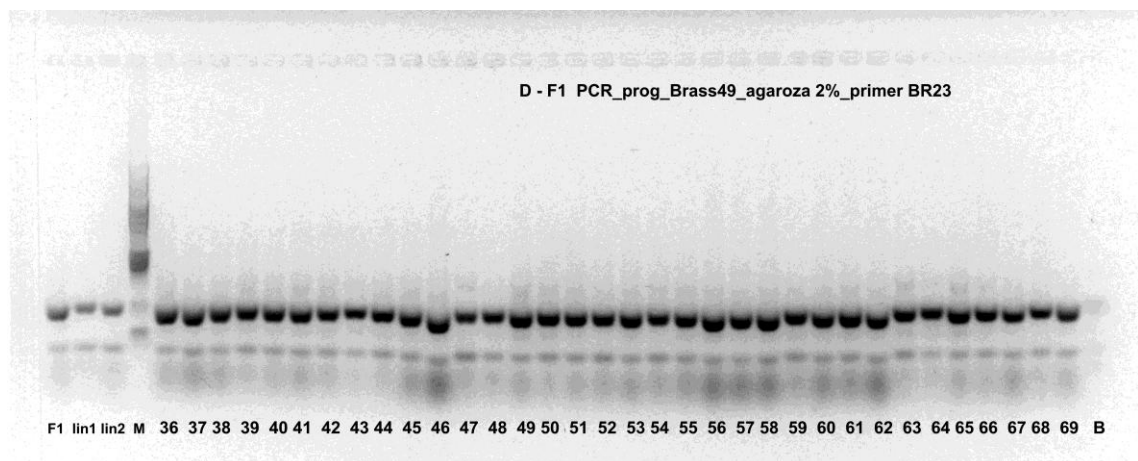
Obr. 34 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass36 II - 2. sada

Níže jsou uvedeny výsledky primerů, které sice amplifikovaly produkty, ale nebyly vyhodnoceny jako vhodné pro rozlišení rodičovských linií a jejich F1 hybridního potomstva.

Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass23 II

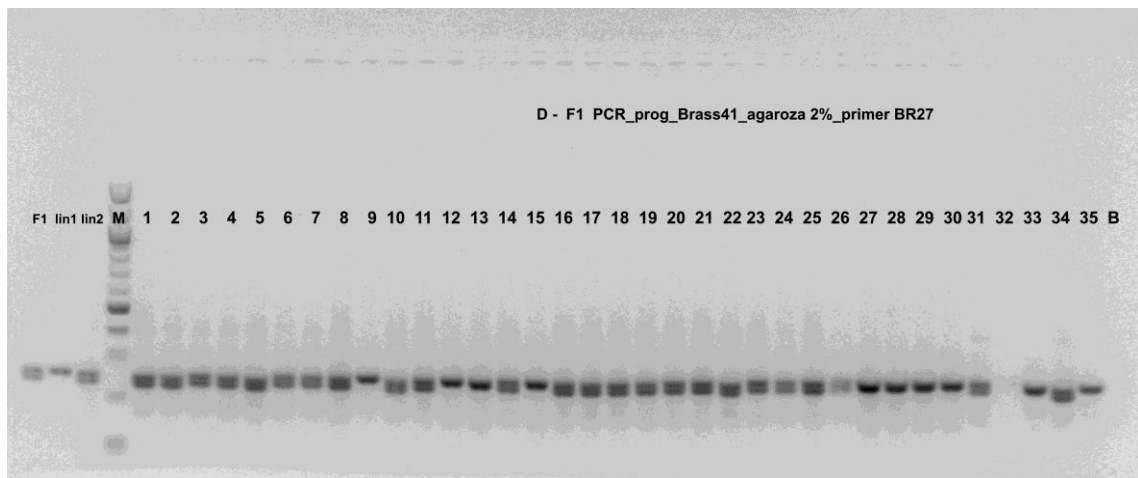


Obr. 23 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass23 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

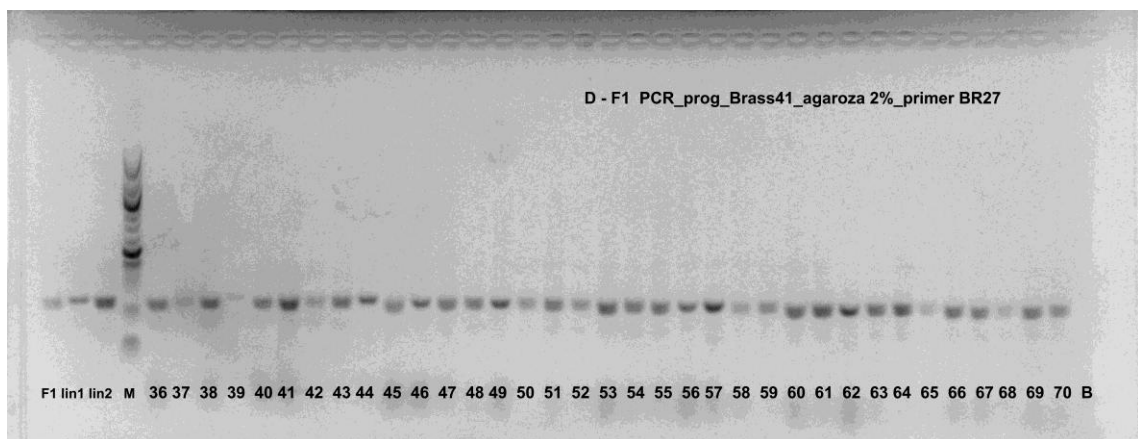


Obr. 24 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass23 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 69 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass27 II

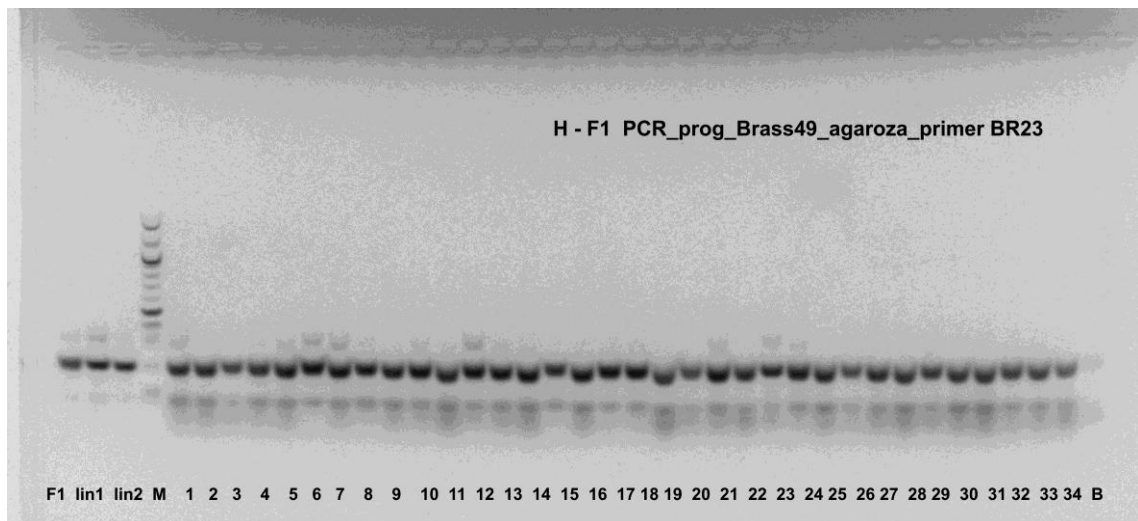


Obr. 25 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass27 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

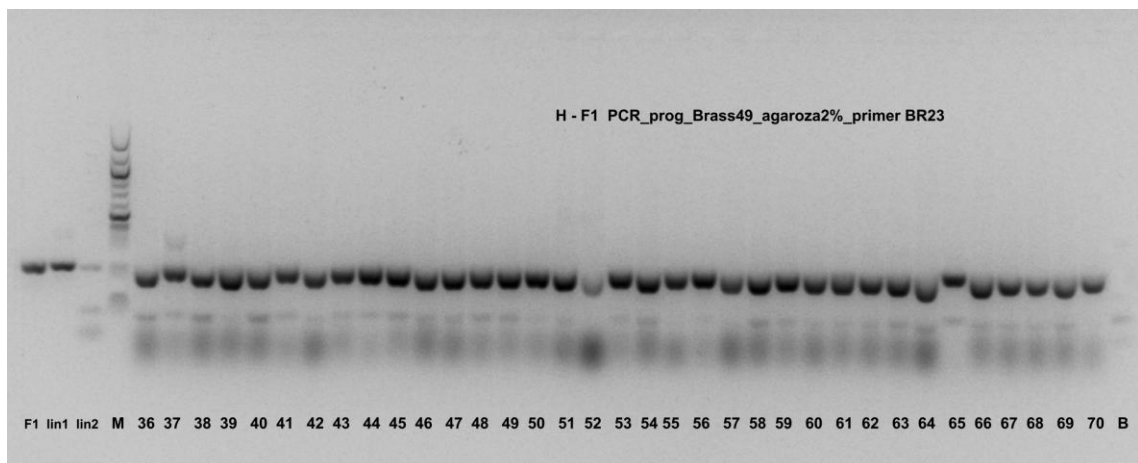


Obr. 26 Analýza hybridního potomstva osiva D - F1 pomocí primeru Brass27 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass23 II

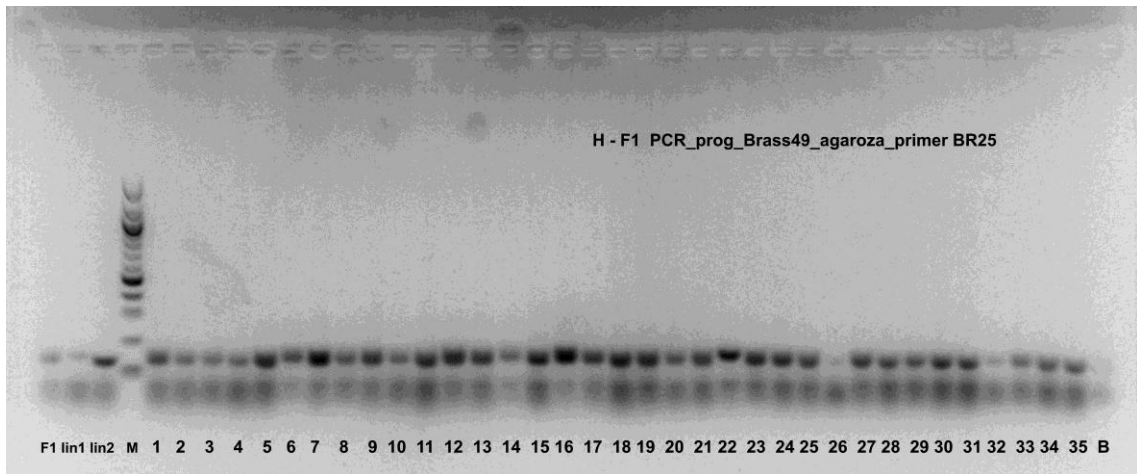


Obr. 27 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass23 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

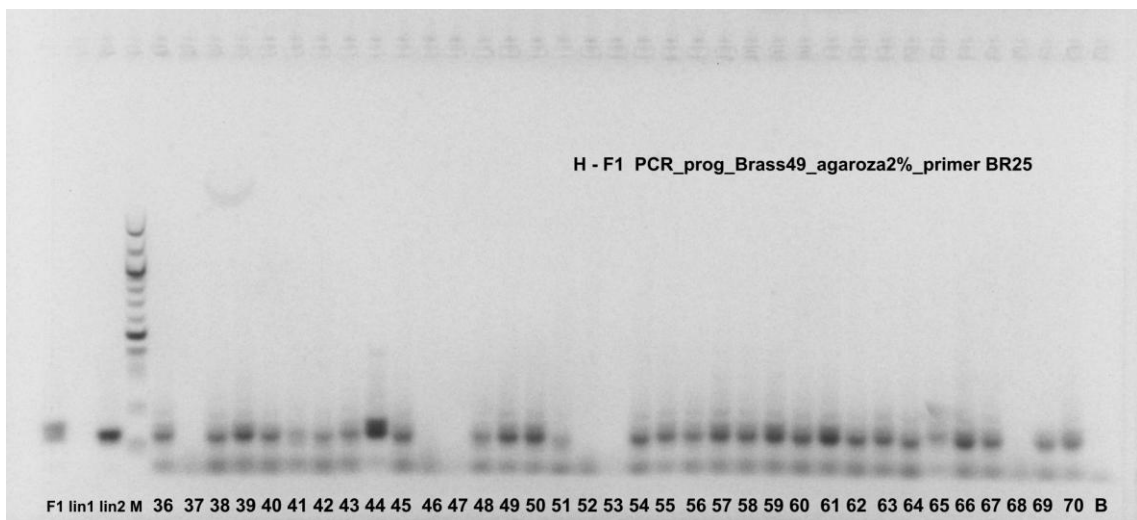


Obr. 28 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass23 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass25 II

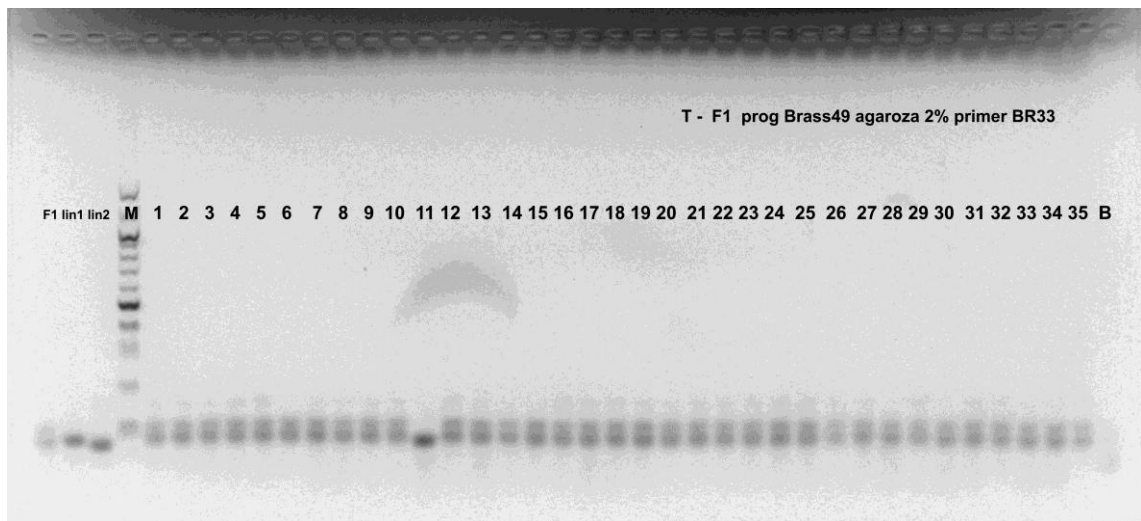


Obr. 29 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass25 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

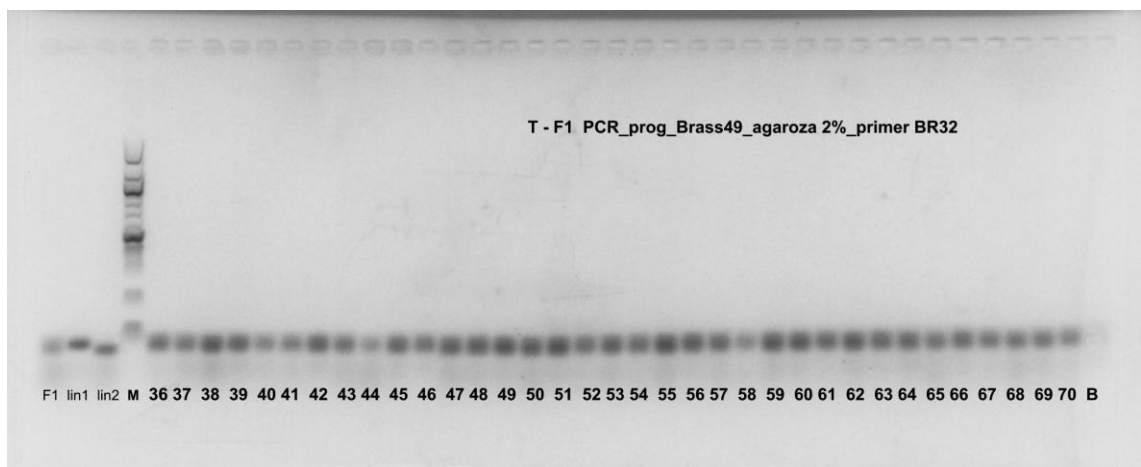


Obr. 30 Analýza hybridního potomstva osiva H - F1 pomocí primeru Brass25 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass32 II

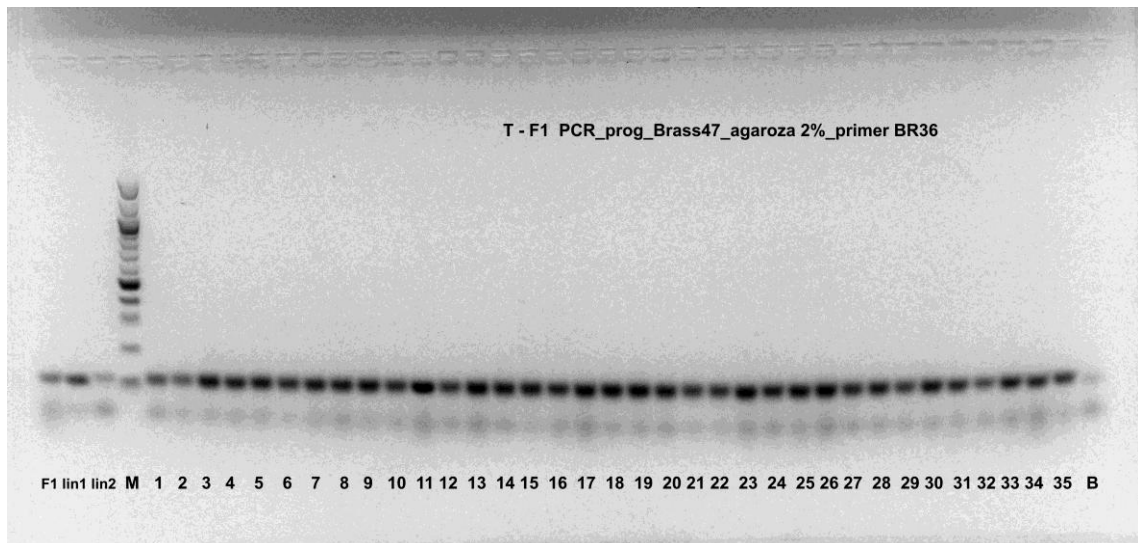


Obr. 31 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass32 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

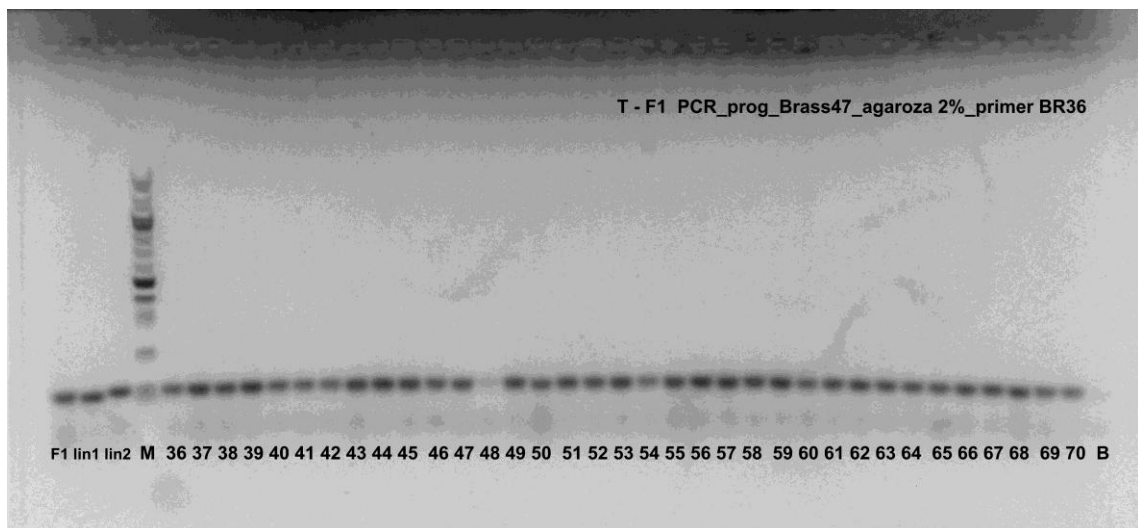


Obr. 32 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass32 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).

Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass36 II



Obr. 33 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass36 II - 1. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 1 - 35 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).



Obr. 34 Analýza hybridního potomstva osiva T - F1 pomocí primeru Brass36 II - 2. sada (F1 = hybridní odrůda, lin 1 a lin 2 = první rodič, druhý rodič, M = hmotnostní a molekulární standard (100 bp), 36 - 70 = vzorky hybridních potomků, B = negativní kontrola).