

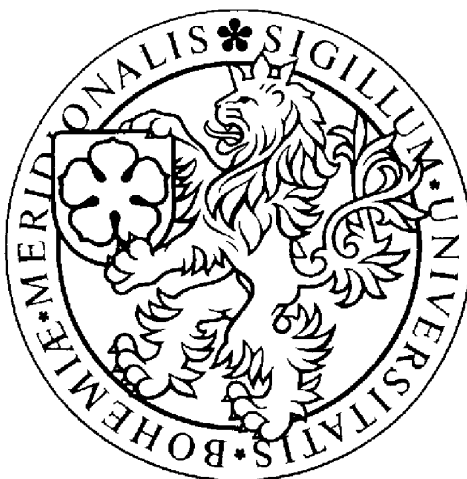
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: 4101T Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Genové inženýrství a šlechtění rostlin



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Marker asistované selekce autoinkompatibilních rostlin řepky

Autor: Lenka Havlíčková

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

České Budějovice

2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Marker asistované selekce autoinkompatibilních rostlin řepky“ vypracovala samostatně, pouze s použitím níže uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 12. 3. 2007

Lenka Havlíčková

Chtěla bych na tomto místě poděkovat všem, kteří mi pomohli při vypracování této diplomové práce. Zvláště děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Vladislavu Čurnovi Ph.D., Ing. Janě Žaludové a Ing. Boženě Koukolíkové za odborné vedení a velmi cenné rady a připomínky při vypracování této práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1. Šlechtění hybridní řepky	8
2.2. Řízené opylení	9
2.2.1. Jaderná samčí sterilita	9
2.2.2. Transgenní pylová sterilita.....	10
2.2.3. Cytoplazmatická samčí sterilita	10
2.2.4. Genově – cytoplazmatická sterilita.....	Chyba! Záložka není definována.
2.3. Autoinkompatibilita	12
2.3.1. Geny odpovědné za AI reakci	12
2.3.2. Genetická struktura S-loku.....	15
2.3.3. Metody detekce S-haplotypů	16
2.4. Molekulární markery	16
2.4.1. Charakteristika a typy molekulárních markerů.....	16
2.4.2. Techniky založené na polymerázové řetězové reakci.....	19
2.4.2.1. PCR.....	19
2.4.2.2. PCR-RFLP	24
2.4.2.3. RAPD	24
2.4.2.4. AFLP.....	28
2.4.2.5. Mikrosatelity	30
2.4.3. Techniky založené na hybridizaci DNA.....	31
2.4.3.1. RFLP.....	31
2.5. Sekvenování.....	33
2.6. Klonování.....	34
2.6.1. Klonovací vektory.....	35
2.6.1.1. Plazmidy	35
2.6.1.2. Bakteriofágy.....	38
2.6.1.3. Kosmidy.....	40
2.6.1.4. YAC vektor.....	42
2.6.2. Transformace plazmidů do hostitelských buněk	42

2.6.3.	Identifikace kolonií s rekombinantní DNA	42
2.6.3.1.	Metoda negativní selekce.....	42
2.6.3.2.	Metoda pozitivní selekce	43
3.	MATERIÁL A METODIKA	44
3.1.	Materiál	44
3.2.	Metody	45
3.2.1.	Izolace DNA z řepky olejné (<i>Brassica napus</i>)	45
3.2.2.	PCR reakce	46
3.2.3.	Příprava agarózového gelu.....	47
3.2.4.	Elektroforéza v agarózovém gelu	48
3.2.5.	Semenný test	48
4.	VÝSLEDKY	49
5.	DISKUZE	56
6.	ZÁVĚR	60
7.	LITERATURA.....	61
8.	PŘÍLOHY	68

1. ÚVOD

Řepka je v současné době považována za vysoce výkonnou univerzální plodinu. Vzhledem k jejímu všestrannému využití se jednotlivé odrůdy řepky rozdělují z hlediska obsahu jednotlivých mastných kyselin na odrůdy vhodné pro potravinářské či pro průmyslové účely (non food) nebo na odrůdy s vícenásobným využitím. Dochází tak i k stále vzrůstajícím nárokům při jejím šlechtění. Základními šlechtitelskými postupy vždy bylo křížení a dlouhodobý výběr na požadované znaky a vlastnosti. Šlechtitelství tedy bylo převážně založeno na trpělivém a časově náročném hodnocení fenotypu tisíců rostlin. Vzhledem k tomu, že vynaložená práce při tvorbě nové odrůdy je zdlouhavá a nově uznané odrůdy většinou jen málo převyšují ty stávající, je využití molekulárních metod ve šlechtění čím dál nezbytnější součástí.

Nástupem molekulární genetiky do oblasti šlechtění tak dochází k výraznému usnadnění, zpřesnění a větší kontrole při šlechtitelské práci. S přibývajícím množstvím informací o funkcích jednotlivých genů v geonomu rostlin se stávají podobné metody klíčové k získání požadovaných vlastností. Jakmile se podaří identifikovat alespoň část genů, které podmiňují ekonomicky významné kvantitativní znaky (QTL), velmi rychle vzroste význam výběru na základě markerů (MAS, marker assisted selection).

Cílem této práce bylo využití molekulárních metod k analýze genů řepky, které jsou zapojeny do autoinkompatibilní (AI) reakce. Řepka, která je přirozeně kompatibilní a alotetraploidní, se jako modelový druh nehodí. Její genom je však tvořen z diploidních geonomů *B. oleracea* a *B. rapa*. AI se jeví jako velmi perspektivní mechanismus pro hybridní šlechtění řepky, avšak přirozeně se vyskytující AI linie řepky jsou poměrně vzácné. Šlechtění těchto linií je navíc obtížné vzhledem k recesivnímu typu AI, který je v tomto materiálu běžný. Proces šlechtění by tak mohl být pomocí možnosti včasné selekce na AI genotypy navržené na základě znalosti funkčních alel genů v AI reakci velice usnadněn.

Na základě vhodného genetického markeru lze tedy zefektivnit výběr šlechtitelského materiálu a identifikovat AI linie s vysokou účinností reakce potřebné k hybridnímu šlechtění. Velice vhodnou technikou je využití PCR a to vzhledem k její nenáročnosti na čas i finance.

Vzhledem k vysoké zahraniční konkurenci a k podmínkám, ve kterých tyto firmy operují s nemalou finanční pomocí a stále narůstajícím vědeckým poznatkům je nutné, v rámci zachování jak českých odrůd řepky, tak i českých firem, zkrátit a zefektivnit šlechtitelský proces.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Šlechtění hybridní řepky

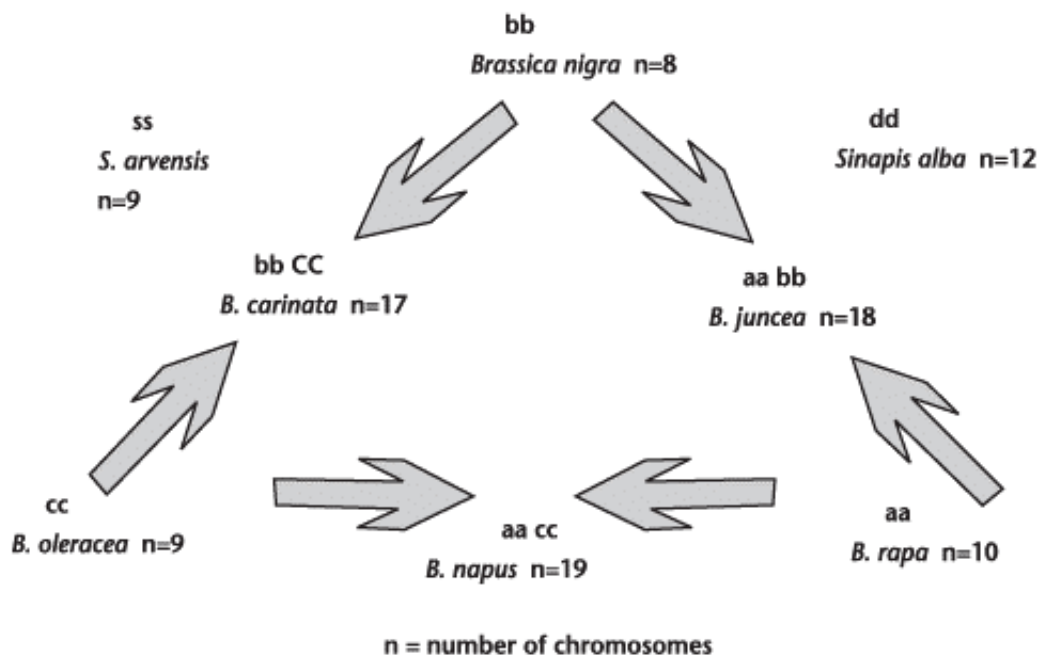
Řepka (*Brassica napus* var. *arvensis*) je spontánním křížencem *B. oleracea* ($2n = 18$) s *B. campestris* (syn. *rapa*) ($2n = 20$) je tedy amfiallotetraploid s 38 chromozomy (obr. 2.1). Za původní genové centrum je považována středomořská oblast (VAŠÁK, 1997). Je řazena do rodu brukev (*Brassica*) a spolu s dalšími asi 170 rody a 2000 druhy do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) (DIEPENBROCK et al., 1999) Z větší části je řepka samosprašná v závislosti na ročníku a odrůdě. Vyskytuje se však i vysoký podíl cizosprašení (30 – 40%) závisující na účasti hmyzu, zejména včel, anemochorii a genetické dispozici. Je řazena mezi sedm nejvýznamnějších olejnin pěstovaných ve světě.

Cílem šlechtění této olejnin je vysoký výnos oleje při olejnatosti přes 45%, obsahu proteinu přes 25%, z mastných kyselin by se pro lidskou výživu neměla vyskytovat kyselina eruková, kyselina linolová pod 25% a linoleová maximálně 5%. Obsah glukosinolátů (GSL) by měl být maximálně 0,6% (do 20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ odtučnělého semene (GRAMAN, 1995)) a snížit by se měl i obsah vlákniny. Kvalita oleje je kontrolována geneticky (CHLOUPEK, 1995).

Biosyntézu mastných kyselin v rostlinách lze enzymaticky kontrolovat tudíž i geneticky a je možné jej tedy měnit. Tímto způsobem bylo vyšlechtěno mnoho odrůd přizpůsobených k danému účelu zpracování.

Pro získání a produkci hybridního osiva u řepky je nutné provést řízené opylení s využitím genové (jadrné), cytoplazmatické či cytoplazmaticko-genové (CMS) pylové sterility. Jevu pylové sterility se využívá k produkci hybridního osiva. Díky pylové sterilitě odpadá nutnost náročné ruční kastrace u mateřských rostlin.

Obr. 2.1. *Brassica napus* - vznik



(<http://www.directfocus.com/canolamanual/chapter2.html>)

2.2. Řízené opylení

K zabránění samosprašení se u řepky olejné využívá několik systémů a to: jaderné samčí sterility (GMS), cytoplazmatické formy samčí sterility (CMS), genově-cytoplazmatické formy pylové sterility a autoinkompatibility (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002).

2.2.1. Jaderná samčí sterilita

Praktický význam pylové sterility (GMS) v klasických šlechtitelských postupech spočívá především v nuceném cizosprašení pro produkci heterozního osiva (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001). Pylová sterilita se projevuje nejčastěji deformací prašníků, jejich zakrtnutím a někdy bývá jejím projevem také neživotný pyl.

Jaderná samčí sterilita je determinována převážně recesivní alelou jednoho genu a je sporofytického typu, nese označení ms (male sterile), nebo rf. Prakticky využitelné dominantní formy genů Ms a Rf byly introdukovány do řepky ozimé také technikou transformace pomocí *Agrobacterium* v kombinaci s tolerancí vůči herbicidům. Linie

s pylovou sterilitou homozygotní pro recesivní gen, se udržují křížením pylově sterilních rostlin s fertilními (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002). Polovina rostlin je pak pylově sterilní, druhou polovinu tvoří heterozygoti, které je nutné a však velmi složité odstranit z mateřských linií (TU et al, 1999).

2.2.2. Transgenní pylová sterilita

Pylová sterilita podmíněná transgenozí je sporofytického typu stejně jako klasický jaderný typ pylové sterility, ale je dominantní. Po křížení pylově sterilních dominantních homozygotů s recesivními pylově fertilními homozygoty vznikají pylově sterilní heterozygoti. Pokud však jsou plody a semena produktem plodiny (kukuřice, rajčata, řepka atd.), je třeba, aby rostliny F_1 generace byly úplně fertilní. Proto druhý partner křížení musí mít gen, který funguje jako obnovitel fertility. Tento systém využívá chimérického genu pro barnázu z *Bacillus amyloliquifaciens*. Barnáza je extracelulární vysoce aktivní nukleáza této bakterie, která degraduje jak RNA, tak DNA. Je syntetizována jako neaktivní pre-proenzym, k jehož jedné úpravě dochází při opuštění bakteriální buňky a odstranění signálního peptidu. Teprve vně bakteriálních buněk dochází ke druhé úpravě a vzniku aktivního enzymu. V bakteriálních buňkách současně existuje vnitrobuněčný inhibitor, protein barstar, který má 89 aminokyselin. Příslušný gen byl rovněž klonován. Upravený zkrácený gen pro barnázu (zbavený sekvencí, jež jsou u vzniklého proteinu upravovány) byl zařazen za promotor specifický pro tapetovou vrstvu buněk tabáku (označen TA29) a vnesen transgenozí do genomu tabáku a řepky olejné. Tím způsobil selektivní destrukci tapetových buněk prašníků a následně degeneraci pylových zrn. Stejný vliv měl i chimérický gen pro ribonukleázu T1 z *Aspergillus oryzae* s promotorem TA29. Pokud se použije obdobným způsobem v jiné transgenní linii gen barstar se stejným promotorem, pak tato linie může působit obdobně jako obnovitel fertility při klasické cytoplazmaticko-jaderné pylové sterilitě (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001).

2.2.3. Cytoplazmatická samčí sterilita

Cytoplazmatická pylová sterilita je kontrolována výlučně faktory přítomnými v cytoplazmě a vyskytuje se velmi vzácně. Genově – cytoplazmatická sterilita je často označována jako cytoplazmatická samčí sterilita CMS (cytoplasmatic male sterility).

Cytoplazmatické faktory samčí sterility (plazmotypy) spolupůsobí s jedním nebo i více párem alel, z nichž jedna je plazmon-senzitivní a s plazmotypem S dává pylově sterilní rostliny. Tato alela je většinou recesivní a označuje se *rf* nebo *ms*. Dominantní alela *Rf* obnovuje s plazmotypem S fertilitu, říká se jí proto obnovitel fertility (restorer). U řepky se vyskytuje několik typů cytoplazmatické pylové sterility, které mají původ ve vnitrodruhovém i mezidruhovém křížení, případně ve spontánní mutaci. V literatuře je popsáno 7 typů, ale nejvýznamnější jsou 4 typy:

CMS nap – nejznámější je tzv. systém „Bronowski“, který pochází z křížení odrůd ozimé a jarní řepky s polskou odrůdou „Bronowski“. Sterilitu pylu kontrolují dva jaderné geny (*rf1rf1*, *rf2rf2*). Systém je však nestálý, podléhá vlivu teploty vzduchu. Byl poprvé popsán Thompsonem v roce 1972, stejný typ objevili Shiga a Obkawa. Někdy je proto tento systém nazýván též Shinga – Thompson (BARTKOWIAK – BRODA, 1991). Podobný je svým projevem i nestálostí typ CMS *cam*, označovaný také jako „japonský“, pocházející z druhu *B. campestris*. Je geneticky shodný s prvním typem a souvisí s genomem BB.

CMS pol – objevený v populaci jarní řepky „Polima“, který je geneticky podmíněný genotypem *rfrf*. Jsou známy i obnovitelé s *Rf* geny. Je méně stabilní (BARSBY, 1987).

CMS jun – pochází z kolekce odrůd druhu *B. juncea*, vyznačuje se vysokou stabilitou a možností obnovy fertility.

CMS ogu – pochází z japonské ředkve druhu *Raphanus sativus* (OGURA, 1968). Do řepky byla přenesena mezirodovým křížením po přenosu jádra druhu *B. oleracea* do cytoplazmy druhu *Raphanus sativus*.

V praktickém využití CMS nastává i nadále problém vhodných udržovatelů sterility a hlavně získání účinných obnovitelů fertility s *Rf* geny, bez negativního ovlivnění dalších znaků a vlastností (BARTKOWIAK – BRODA 1991).

Pro tvorbu hybridů na bázi CMS lze využít systém, který se skládá ze tří komponentů (NOACK et al., 1999).

1. sterilní mateřská linie produkující posléze hybridní osivo
2. fertilní udržovatel sterility sloužící k namnožení sterilní linie
3. obnovitel pylové fertility využívaný jako otcovská odrůda

2.3. Autoinkompatibilita

Autoinkompatibilita (AI) je mechanismus, kterým rostlina zabraňuje samoopylení. Podstatou tohoto mechanismu je schopnost rostliny rozpoznat vlastní pyl a ukončit jeho vývoj ještě před oplozením. Na rozdíl od jiných rozpoznávacích systémů (např. savčího imunitního systému), zde dochází k aktivaci příslušných drah pouze při styku s vlastní tkání.

Autoinkompatibilita se dělí do dvou typů a to sporofytického a gametofytického. U sporofytického typu dochází k interakci exiny s papilárními buňkami blizny. Jde tedy o styk dvou diploidních tkání. Zda bude rostlina autoinkompatibilní je určeno genomem rodičovské rostliny. U gametofytického typu spolu interagují haploidní láčka s diploidními tkáněmi blizny a čnělky.

Většina systémů autoinkompatibility je pod kontrolou jednoho mnohoalelového *S*-lokusu (s výjimkou čeledi *Poaceae*, kde jsou lokusy dva *S* a *Z*). Sporofytická AI je charakteristická pro čeledi: *Brassicaceae* (brukvovité) a *Asteraceae* (hvězdnicovité). Gametofytická AI je charakteristická pro čeledi: *Solanaceae* (lilkovité), *Scrophulariaceae* (krtičnickovité), *Rosaceae* (ružovité), *Papaveraceae* (mákovité) a *Poaceae* (lipnicovité) (HISCOCK et al., 1993).

AI je z šlechtitelského hlediska velice žádaným znakem, protože při křížení dvou AI linií je možno získávat hybridní potomky z obou rodičovských linií (na rozdíl od CMS, kde jsou potřeba linie opylovačů, ze kterých se nesklízí osivo, což je ekonomicky méně výhodné). Pro udržování AI linií je navíc možno AI reakci potlačit postřikem soli (NaCl). Příbuzné druhy *B. oleracea* a *B. rapa* (syn. *campestris*) jsou běžně autoinkompatibilní, řepka olejná amfidiploid těchto dvou druhů (obsahuje jeden diploidní genom z každého druhu), která je ekonomicky významnější je v naprosté většině případů samosprašná (kompatibilní).

2.3.1. Geny odpovědné za AI reakci

Při hledání genetického založení autoinkompatibility, se zjistilo, že je kontrolována *S*-lokusem, (sterility locus) který má velký počet alel (OCKENDON, 1974). Jednotlivé alely tohoto lokusu, nazývané též *S*-alely, byly podle svého účinku rozděleny do dvou tříd podle typu dědičnosti: typ I (dominantní) a typ II (recesivní). První typ se vyznačuje silnou

AI reakcí (0 – 10 semen na šesuli) a dominancí nad typem II. Typ II se vyznačuje slabší AI reakcí (10 – 30 semen na šesuli) a recesivitou vzhledem k typu I (NASRALLAH et al., 1991) Molekulární analýza *S*-lokusu ukázala, že obsahuje minimálně tři geny odpovědné za AI reakci. Tyto geny jsou v těsné vazbě a všechny se vyznačují vysokým stupněm polymorfizmu. Těmito třemi geny jsou: SLG (*S*-locus glycoprotein, 1,3 kb), SRK (*S*-locus receptor kinase, 3,5 kb) SCR (*S*-locus cysteine rich protein) (NASRALLAH et al., 1994, STEIN et al., SUZUKI et al., 1999).

Gen **SLG** kóduje sekreci glykoproteinu, který je syntetizován v papilárních buňkách během zrání blizen. Přestože se vyskytuje v mnoha alelických formách v jeho sekvenci se vyskytují konzervované motivy, 12 cysteinových reziduí v blízkosti C-konce a dvě N-glykosilační místa, která jsou patrně nutná pro normální funkci SLG proteinu. Sekvenční analýza SLG alel potvrdila rozdělení *S*-lokusů do dvou tříd. SLG geny třídy II (recesivní) obsahují poblíž 3' konce 200 bp dlouhý intron, zatímco SLG třídy I nikoliv. Vzájemná sekvenční podobnost obou tříd je asi 65 %. Některé geny SLG II navíc produkují kromě sekretované formy mechanismem alternativního splicingu ještě formu vázanou na buněčnou membránu. Podařilo se ovšem prokázat, že tento fenomén není sám o sobě příčinou recesivity ke genům třídy I (HATAKEYAMA et al., 1998). SLG byl první intenzivně studovaný gen *S*-lokusu, jeho funkce je však zatím nejasná. V polovině devadesátých let byly objeveny AI linie, které produkovaly nízkou hladinu exprese SLG. Tuto skutečnost potvrdily pokusy s transgenními řepkami. Ukázalo se, že SLG je patrně nutný pro normální fungování (nutná alespoň bazální exprese SLG), nicméně síla exprese SLG nekoreluje se sledovanou silou AI reakce. Podle posledních výsledků, bez SLG vytváří protein SRK vysokomolekulární shluky, které zabraňují normální funkci SRK (DIXIT et al., 2000).

Druhým důležitým genem *S*-lokusu je **SRK**, který kóduje serin-threoninovou kinázu skládající se ze tří domén. Extracelulární (receptorová nebo *S*-doména) doména vykazuje značnou homologii k SLG (vzájemná podobnost však není závislá na příslušnosti k určitému haplotypu, dokonce ani druhu, ze kterého SLG a SRK pocházejí (CHARLESWORTH, AWALDA, 1998)) a obsahuje stejné konzervované motivy (12 cysteinových reziduí a N-glykosilační místa). *S*-doména je spojena transmembránovou

doménou s doménou kinázovou, která má ser/thr kinázovou aktivitu (GORING, ROTHSTEIN, 1992). Tato doména je podobná kinázám, které se podílejí na obraných reakcích rostlin proti patogenům. Někteří autoři proto soudí, že AI by mohla mít původ právě v obraných reakcích (PASTUGLIA et al., 1997). V S3 lokusu *B. oleracea* se podařilo nalézt zkrácenou formu SRK tzv. eSRK (extracellular domain of SRK), která obsahuje pouze S-doménu a není vázána na buněčnou membránu. Podobné zkrácené formy receptorových kináz byly nalezeny i v živočišných signálních drahách (PDGF receptor, EGF receptor, (GIRANTON et al., 1995)). SRK se po navázání SCR aktivuje. Na fosforylovanou kinázovou doménu se pak váže specificky protein ARC (Arm Repeat Protein) (GU et al., 1998, STONE et al., 1999), který pravděpodobně prostřednictvím dalších faktorů reguluje činnost aquaporinů (u řepky MOD like protein, známa mutace mod, způsobující kompatibilní fenotyp) v papilárních buňkách, čímž je blokována hydratace adherujících pylových zrn a tím ukončen vývoj pylového zrna.

Tyto dva geny jsou považovány za geny, které se podílí na schopnosti blizny rozeznat příbuzný a nepříbuzný pyl. Oba geny jsou vysoce polymorfní a jejich exprese byla zjištěna pouze na povrchu zralých blizen (SATO et al., 1991, STEIN et al., 1991).

SCR syn. SP11 (SUZUKI et al., 1999) je třetí gen S-lokusu (nazývaný též samčí determinant) podílející se na AI reakci a představuje samčí ligand. Od poloviny devadesátých let byl intenzivně hledán gen, který by měl tyto vlastnosti: byl by vázán na S-lokus, exprimován specificky v obalu pylových zrn a byl polymorfní. Gen požadovaných vlastností byl objeven v r. 1999 (SUZUKI et al., 1999) a byl nazván SCR podle osmi konzervativních cysteinových zbytků, které mu dávají charakteristickou 3D strukturu. Tento gen je příbuzný skupině samčích proteinů označovaných jako PCP (Pollen Coat Proteins), o kterých je známo, že mají určitou afinitu k SLG a SLR1 (DOUGHTY et al., 1998). Gen SCR je podle SCHOPFERA (1999) v genové vazbě s geny SLG a SRK. Skutečnost, že SCR je samčím determinantem byla prokázána dvěma odlišnými postupy. Za prvé byly jedinci S2 haplotypu transformováni genem SCR z S6 haplotypu. Pyl transformovaných rostlin byl odmítán rostlinami S6 haplotypu (SCHOPFER et al., 1999). Za druhé se podařilo uměle vyvolat AI reakci použitím rekombinantního SCR proteinu z *E. coli*. Pokud byl rekombinantní protein uměle aplikován papilárním buňkám stejného haplotypu byl blokován pyl jakéhokoliv haplotypu,

se kterým by se měla mateřská rostlina normálně sprašovat. Do dneška bylo izolováno dvacet různých alel SCR, všechny s osmi konzervovanými cysteinovými zbytky a potvrdil se i vysoký sekvenční polymorfismus (WATANABE et al., 2000). Podobné alely genu SCR třídy I jako u rodu *Brassica* byly objeveny u rodu *Raphanus* (OKAMOTO et al., 2004).

Alely genů SLG a SRK třídy II mají z fylogenetického hlediska odlišný původ než alely třídy I (HINATA et al., 1995, KUSABA et al., 1997). Obdobné pozorování bylo provedeno i u alely genu SCR (SHIBA et al., 2002). Při mezidruhovém křížení druhů *Brassica napus* a *Brassica oleracea* se na pozadí druhu *Brassica napus* jevíly S-alely druhu *Brassica oleracea* jako dominantní (RIPLEY, BEVERSDORF, 2003).

Specifita je v AI reakci určena alelově specifickou interakcí mezi SRK receptorem a SCR ligandem. Z toho vyplývá, že geny SRK a SCR se musí vyvíjet zároveň, aby se udržela jejich interakce (CHOOKAJORN et al., 2004). Statisticky bylo prokázáno, že geny SP11 a SRK jednoho S-haplotypu u druhů *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* se odchyľují souběžně (SATO et al., 2002).

2.3.2. Genetická struktura S-lokusu

Klasickými genetickými postupy byl S-haplotyp definován jako jediný mendelovský lokus (S-lokus). Rekombinace mezi SLG a SRK nebyla nikdy pozorována, přestože bylo testováno 500 rostlin generace F₂ (BOYES et al., 1997). Fyzikální hranice S-lokusu nejsou jednoznačně určeny. Teoreticky by mohly být hranice S-lokusu určeny zamapováním nejbližších rekombinačních bodů v okolí genů SLG a SRK tj. určit oblast S-lokusu, kde je rekombinace signifikantně nižší než je průměrná frekvence rekombinace v jiných částech genomu podobně jako se podařilo definovat hranice mt (mating type) lokusu u řasy *Chlamydomonas* (FERISH, GOODENOUGH, 1994). Vzhledem k nízké hustotě molekulárních markerů a nutnosti testovat stovky jedinců F₂ k detekci vzácných rekombinací nejsou zatím přesné hranice S-lokusu známy. Nicméně vzhledem k hustotě genů v nejbližším okolí genů SLG a SRK se jeho velikost odhaduje na 50 – 200 kb (může být variabilní u různých S-lokusů).

2.3.3. Metody detekce S-haplotypů

Původně se jednotlivé S-haplotypy identifikovaly pomocí testovacích skupin linií se známými haplotypy což je však vzhledem ke generační době řepky časově velmi náročné (5 měsíců, u ozimých odrůd je navíc nutná jarovizace). K identifikaci jednoho haplotypu mezi např. 50 jinými je potřeba minimálně 100 křížení (jsou nutná reciproční křížení). Navíc na sílu AI reakce mají vliv fyziologické podmínky (především teplota a vlhkost), proto je nutné každé křížení několikrát opakovat, což nepředstavuje příliš efektivní způsob identifikace jednotlivých haplotypů.

Proto se v posledních desíti letech přešlo na identifikaci pomocí molekulárních znaků S-haplotypů. Nejspolehlivější metodou je identifikace pomocí Southernovy hybridizace (NASRALLAH et al., 1985, OKAZAKI et al., 1999) pomocí prob specifických pro SLG nebo SRK. Vzhledem k vysokému polymorfismu S-lokusů (a tudíž různé distribuci restrikčních míst v okolí SLR a SRK) je možné podle spekter hybridizujících fragmentů rolišit jednotlivé haplotypy. Tento postup je však finančně náročný, vyžaduje dostatek času a proto není zcela ideální pro rutinní testování velkého množství jedinců (ŠIMONOVSKÝ, 2001).

Pro finanční nenáročnost a rychlost zpracování jednotlivých vzorků jsou pro identifikaci haplotypu nejvhodnější metody založené na PCR. Podle sekvencí v genové bance je možno nasyntetizovat vhodné primerové páry pro SLG nebo SRK. Takto je možné bezpečně rozlišit recesivní haplotypy od dominantních. V kombinaci s restrikčním štěpením PCR produktů restrikčními enzymy (metoda PCR-RFLP, BRACE et al., 1993, 1994; NISHIO, SAKAMOTO, 1993) je možno určitému haplotypu přiřadit konkrétní restrikční spektrum takto vzniklých fragmentů. Kombinací tří restriktáz se zatím podařilo identifikovat všechny známé haplotypy u rodu *Brassica* (NISHIO et al., 1997).

2.4. Molekulární markery

2.4.1. Charakteristika a typy molekulárních markerů

Genové inženýrství umožňuje využívat pro charakterizaci genomů jednotlivých odrůd kulturních rostlin, hospodářských zvířat i pro získání individuálního profilu jednotlivých osob molekulární znaky DNA (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002). Pomocí DNA

markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, kterou sledovaní jedinci nesou. Dříve byly jako molekulární markery používány především bílkoviny a jejich různé varianty, tzv. izoenzymy. V současné době se však využívá nejčastěji DNA markerů, které jsou oproti izoenzymům více variabilní a mohou charakterizovat celý genom (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001). Narozdíl od proteinových markerů nejsou tak významně ovlivněny prostředím a není tedy narušena jejich selektivní neutrálnost, což v některých případech nebývá splněno u izoenzymových markerů, na které může selekce působit buď přímo, nebo skrze geny vystavenými selekci, s nimiž bývají často ve vazbě (BERGMANN, 1975).

Využívání molekulárních markerů v praxi znamená, že není třeba hodnotit obtížné hodnotitelný znak (například odolnost k houbovému onemocnění), ale je možno si vybrat molekulární znak, který se na chromozomu nachází velmi blízko genu pro odolnost k houbovému onemocnění. V potomstvech je pak možno přesně sledovat přenos tohoto molekulárního znaku (na základě sondy DNA) v zastoupení nepřesně sledovatelného znaku (odolnosti k houbovému onemocnění, například padlí ječmene). Je to podstatné zpřesnění a zvýšení možností využití vazbových map kulturních rostlin. Molekulární mapování umožňuje podstatně urychlit a zpřesnit proces šlechtění (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002). Například v případě potřeby stanovení patogenního agens z vegetativního vzorku je zapotřebí při kultivačních metodách minimálně 2-3 týdnů. Při imunologických testech pak tato doba činí včetně přípravy vzorku cca 24 hodin, u polymerázové řetězové reakce je možno tuto dobu zkrátit na 2 - 4 hodiny (JANKOVSKÝ, ŠMERDA, 2003).

Podle ONDŘEJE (1985) lze sekvence DNA v eukaryontním genomu podle počtu opakování dělit na tři základní typy:

- Velmi často se opakující sekvence (10 000krát častěji).
- Středně se opakující sekvence (několikrát až deset tisíckrát).
- Neopakující se sekvence (jedinečné sekvence – single copy CHLOUPEK, 1995).

Tyto sekvence mají rozličné funkce a význam (kódující, regulační a nekódující sekvence). Je prokázáno, že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (CHLOUPEK, 1995).

Rozdělení markerů dle využití při mapování genomu:

I. typ – kódující exprimované geny, mohou být kandidátními geny pro QTL (Quantitative Trait Loci). Mají nízkou hladinu polymorfismu, jsou málo použitelné pro studie diverzity rodin a populací. Využívají se ale významně v komparativním (srovnávacím) mapování.

II. typ – vysoce variabilní sekvence DNA. Zde se využívají především mikro a minisatelity. Vlivem vysokého stupně polymorfismu (velký počet alel) jsou mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, a jsou základem pro vazbové mapování genů. Tyto markery nemají přímo vliv na variabilitu znaku, ale mohou být ve vazbě s QTL.

III. typ – jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které mohou ležet uvnitř kódujících genů, ale častěji v nekódujících intronech nebo intergenových oblastech. Jsou využitelné pro populační a rodinné studie. Vyskytují se v genomu přibližně každých 500 - 1000 bp. Význam získávají s rozvojem automatických metod screeningu (micro arrays) (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002).

Rozdělení markerů dle charakteru svého polymorfizmu:

a) Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism).

b) Polymorfismus v délce sekvence (SSLP – Simple Sequence Length Polymorphism). Zahrnuje mikrosatelity (též označované STR – Short Tandem Repeats) a minisatelity (též označované VNTR – Variable Number Tandem Repeat). Sem patří i vzácně se vyskytující delece nebo inserce v intronové části způsobené např. transpozony.

c) Polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP – Single Nucleotide Polymorphism). Jedná se o bodové mutace. Některé mohou být detekovány jako RFLP. V případě, že neexistuje rozpoznávací místo pro restriktázu, lze k detekci použít DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) nebo SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), případně pouze sekvenování. Většinou jsou to bialelické markery (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002).

Z hlediska použité metody se DNA markery dělí na:

1. markery založené na polymerázové řetězové reakci

2. markery založené na hybridizaci DNA

2.4.2. Techniky založené na polymerázové řetězové reakci

Rozdíly mezi metodami, spadajícími do této kategorie, spočívají v různých délkách a sekvencích použitých primerů, přísnosti PCR podmínek a metodou separace a detekce fragmentů (KARP, EDWARDS, 1997). Všechny PCR techniky používají k amplifikaci DNA produktů (včetně produktů odvozených z RNA) primery.

2.4.2.1. PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je metoda *in vitro* amplifikace specifického fragmentu DNA o známé sekvenci bazí. Podmínkou použití této metody je znalost sekvence v bezprostředním sousedství úseku DNA určeného k amplifikaci. Vlastní sekvence tohoto úseku nám však známa být nemusí. Pomocí této metody je tedy možné selektivně naamplifikovat určité oblasti genomu z několika málo kopií do řádově bilionů kopií, pokud známe sekvence ležící v blízkosti této cílové oblasti (obr. 2.2).

Složení reakční směsi PCR

- * templát či matrice – DNA obsahující požadovaný úsek, který chceme amplifikovat (amplikon).

- * prekurzory DNA – deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) sloužící k syntéze polynukleotidového řetězce, které se s přidaným termostabilním enzymem *Taq* polymerázou stávají zárodkem pro syntézu nového vlákna. Poměr C, G, A, T by měl být ve stejném množství.

- * dvojice primerů (tzv. „forward“ a „reverse“), což jsou krátké oligonukleotidové jednořetězcové specifické „matricové“ úseky DNA ohraničující amplikon. Primery by neměly být mezi sebou komplementární, zejména na 3' konci, kde může překrytí dvou

nebo tří bází způsobit vznik oligodimerů (tzv. primer misspairing), zvláště při nadbytku primeru.

- * Mg^{2+} či jiné ionty nezbytné pro DNA-polymerázu.

- * voda vhodná pro PCR – redestilovaná, destilovaná a následně deionizovaná atd. s vodivostí do 0,2 $\mu S/ml$).

Reakce se provádí v termocyklerech dle zvoleného programu.

Příprava PCR

V závislosti na četnosti vzorků daného běhu je vypočteno množství výchozích komponentů tvořících reakční směs a to dle pokynů výrobce daného kitu.

Připravená reakční směs se rozpipetuje do jednotlivých zkumavek v množstvím uvedeném výrobcem kitu. Do každé zkumavky (kromě tzv. beztemplátové kontroly) se přidá příslušný izolát DNA (neředěný nebo v optimálním ředění podle potřeby).

Při amplifikaci DNA ze stanovených vzorků se používají tyto kontroly:

Vnitřní kontrola: templátová DNA, která obsahuje úsek DNA specifický pro daný rostlinný druh; amplifikace tohoto úseku potvrzuje kvalitu vyizolované DNA (je schopna amplifikace). Při elektroforetickém vyhodnocení má dát odpovídající pruh na gelu; používá se pro vyloučení falešně negativního výsledku.

Pozitivní kontrola (P): templátová DNA, která obsahuje úsek DNA specifický pro danou genetickou modifikaci; amplifikace této sekvence po elektroforetickém vyhodnocení dá na gelu pruh odpovídající svou polohou délce této sekvence.

Negativní kontrola (N): templát, kde příslušná GM sekvence chybí; při elektroforetickém vyhodnocení se nesmí na gelu objevit pruh odpovídající délce této sekvence.

Beztemplátová kontrola (BT): obsahuje všechny složky PCR kromě templátové DNA; ověřuje čistotu reakční směsi od náhodné kontaminace templátovou DNA, vylučuje falešně pozitivní výsledek amplifikace. Při elektroforetickém vyhodnocení se na gelu nesmí objevit pruh odpovídající délce hledané transgenní sekvence (SUCHOMELOVÁ, 2004).

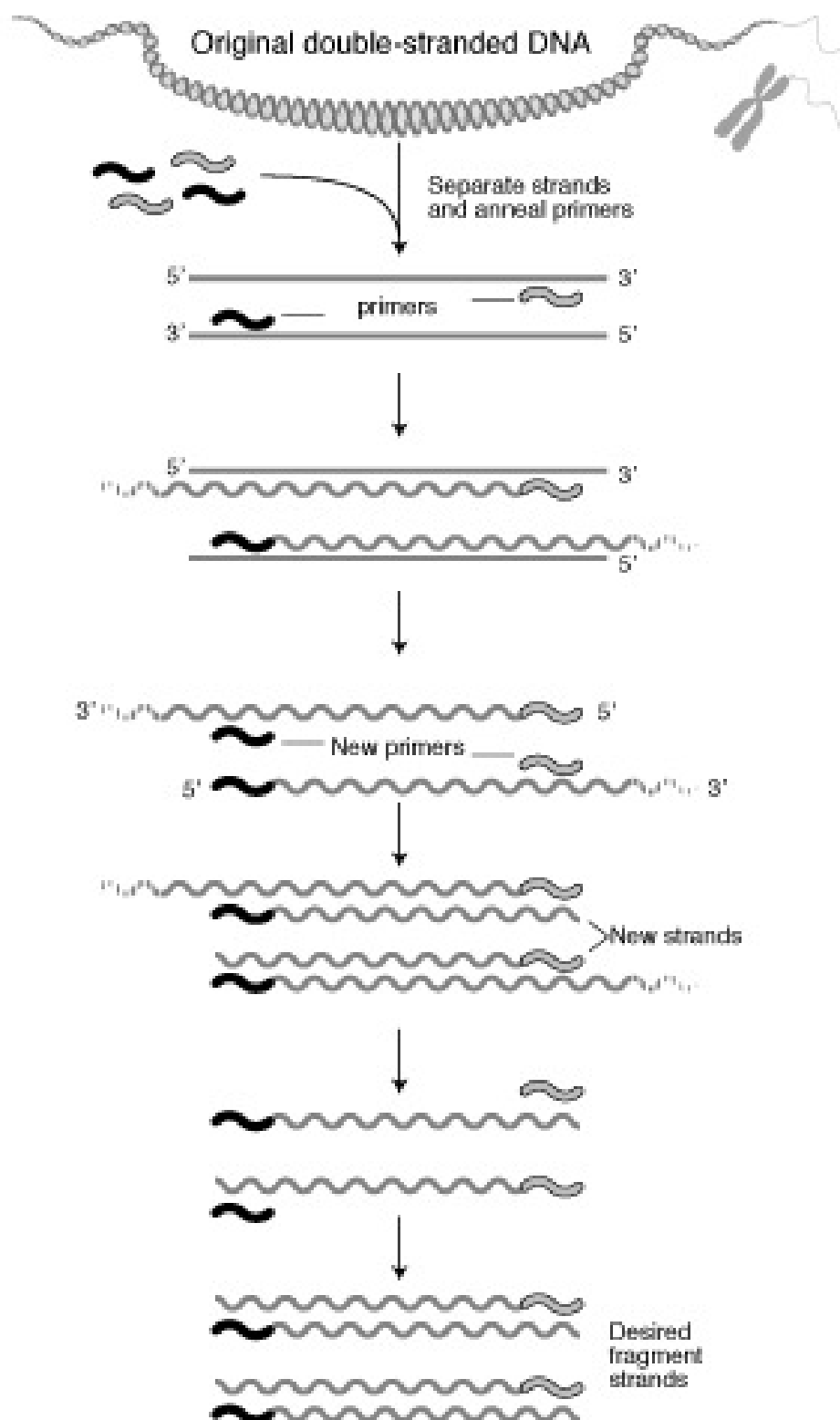
Průběh reakce PCR

PCR reakce se skládá ze tří po sobě jdoucích kroků, které se liší teplotními podmínkami.

- Teplotní denaturace dsDNA – zahřátí roztoku DNA na takovou teplotu (zpravidla 90–95°C), při níž se oba komplementární řetězce dvoušroubovice zcela disociují od sebe.
- Teplotní hybridizace (annealing) – při němž je reakční směs zchlazena na teplotu (35–65°C dle použitého primeru) a jsou připojeny specifické amplifikační primery k 5' koncům dvou jednovláknových matricových řetězců. Každý primer je připojen k specifickému (komplementárnímu) místu na templátu díky své specifické sekvenci. Tak je 5' konci primerů vymezen daný amplikon.
- Syntéza dvouřetězcové DNA – prodlužování primerů (extension) – DNA-polymeráza katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby nejdříve mezi 3' uhlíkem na konci primeru a 5' uhlíkem prvního volného nukleotidu, dále mezi 3' uhlíkem tohoto nukleotidu a 5' uhlíkem následujícího atd. Dochází tedy k zabudování volných dNTPs do nově vznikajícího řetězce podle templátové DNA. Tento řetězec je prodlužován ve směru 5' → 3'. Fáze reakce obvykle probíhá při teplotě 72°C.

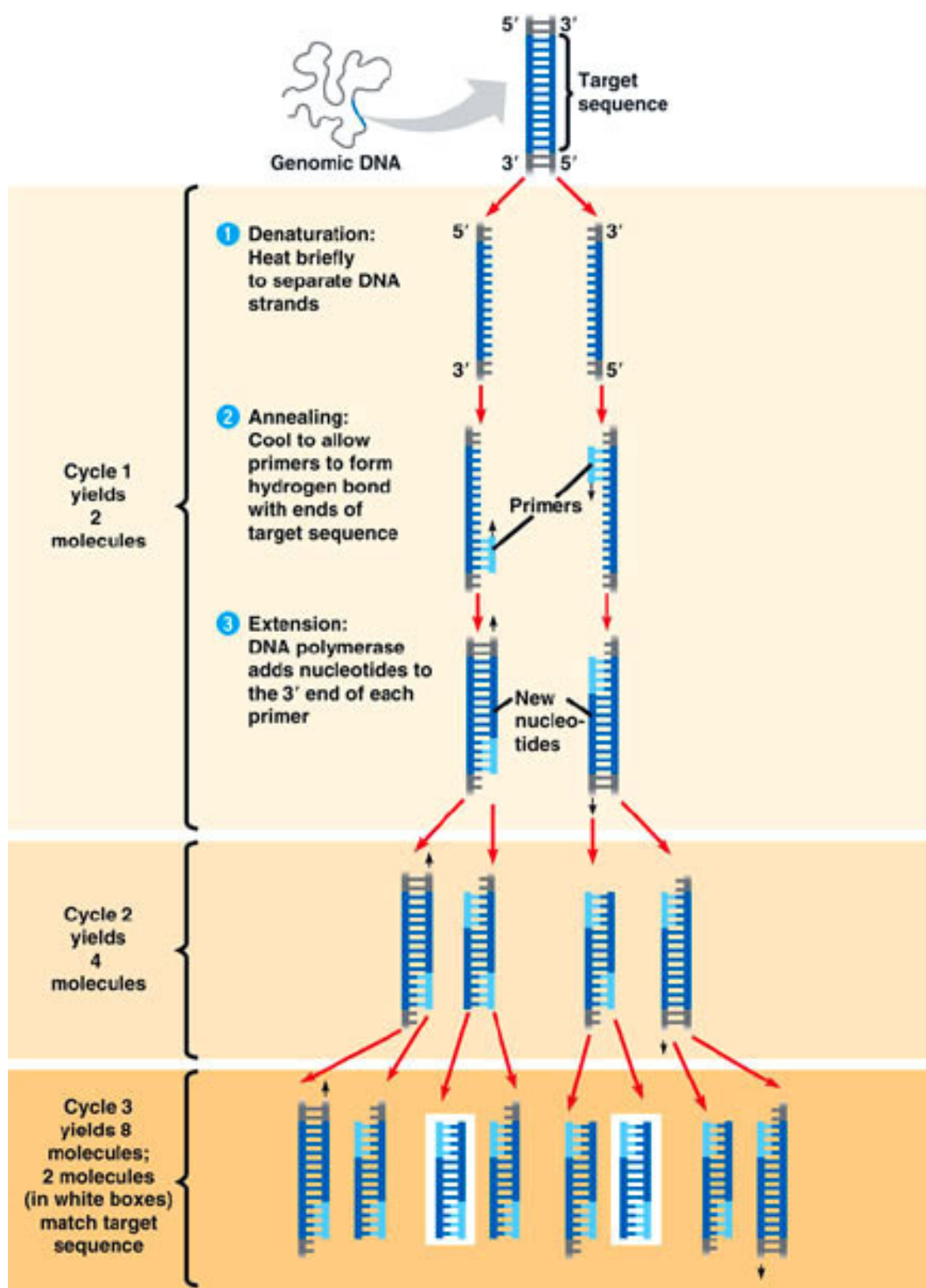
Tyto tři kroky se cyklicky opakují. Každý krok trvá obvykle 1-2 minuty. Počet cyklů se většinou pohybuje kolem 30-40ti, přičemž množství nasyntetizovaných sekvencí přibývá exponenciální řadou (2^n ; n = počet cyklů) (obr. 2.3).

Obr. 2.2. Průběh PCR



(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/he/thumb/a/a5/PCR.gif/180px-PCR.gif>)

Obr. 2.3. Exponenciální amplifikace cílového fragmentu DNA s přibývajícím počtem cyklů



(<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>)

2.4.2.2. PCR-RFLP

Pomocí PCR se na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí souborem restrikčních endonukleáz. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém, nebo PAGE gelu. Vizualizace DNA se provádí pomocí ethidium bromidu. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace (polymorfizmu) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. Metoda je vhodná pro geny s větším polymorfizmem nebo nekódující sekvence (analýzy intronů) (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002).

2.4.2.3. RAPD

RAPD – polymorfizmus náhodně amplifikované DNA (Random Amplified Polymorphic DNA) je jednou z metod založených na PCR. Využívá toho, že do amplifikace vstupuje pouze jeden náhodný primer o délce deseti nukleotidů (dekanukleotid). Princip metody je v tom, že se několikrát v celém úseku studované DNA stane, že primery nasednou na protiběžných řetězcích DNA v amplifikovatelné vzdálenosti od sebe (do cca 4 kb). V tuto chvíli je umožněna amplifikace části DNA mezi nimi (obr. 2.4).

Délka používaných primerů je na dolní hranici použitelnosti a zvyšuje pravděpodobnost, že v genomu, o němž nejsou k dispozici žádné sekvenční informace, bude nalezeno místo s alespoň částečnou homologií. Během reakce dochází k amplifikaci řady produktů lišících se délkou a interním nukleotidovým složením. Zájem se upírá jen na to, který z primerů vykazuje u studovaných vzorků polymorfní spektrum. Rozdíl oproti klasické PCR je ten, že se používá vždy jen jeden primer, který přisedne k homologním místům v protilehlých řetězcích dvoušroubovice. Vzdálenost primerů mezi nimiž dochází k amplifikaci zpravidla nepřesahuje 2000bp. Reakce probíhá v programovatelném termocykleru. Frekvence alel jsou spočítány z přítomnosti či nepřítomnosti konkrétních amplifikovaných produktů, které jsou ve většině případů elektroforeticky separovány na agarózovém gelu. K vizualizaci je použit ethidium bromid.

RAPD vykazují vysoký stupeň polymorfizmu, a proto mohou být genetickými markery pro tvorbu genetických map, mapování QTL, fingerprinting, měření genetických vzdáleností mezi populacemi atp. RAPD mají dominantní charakter – proto nelze odlišit hetero- a homozygotní genotyp.

Pro získání reprodukovatelných výsledků jsou kritické především tyto faktory:

- přesná optimalizace koncentrace DNA
- reprodukovatelnost cyklu
- kvalita a koncentrace primerů
- koncentrace Mg^{2+}
- výběr DNA polymerázy
- přesnost při pipetování (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002)

Výhody metody RAPD:

1. nízké náklady a malá pracnost (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002).
2. RAPD na rozdíl od specifické PCR nevyžaduje znalost cílových sekvencí DNA (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001).
3. použitá DNA nemusí být purifikovaná a postačí v malém množství.

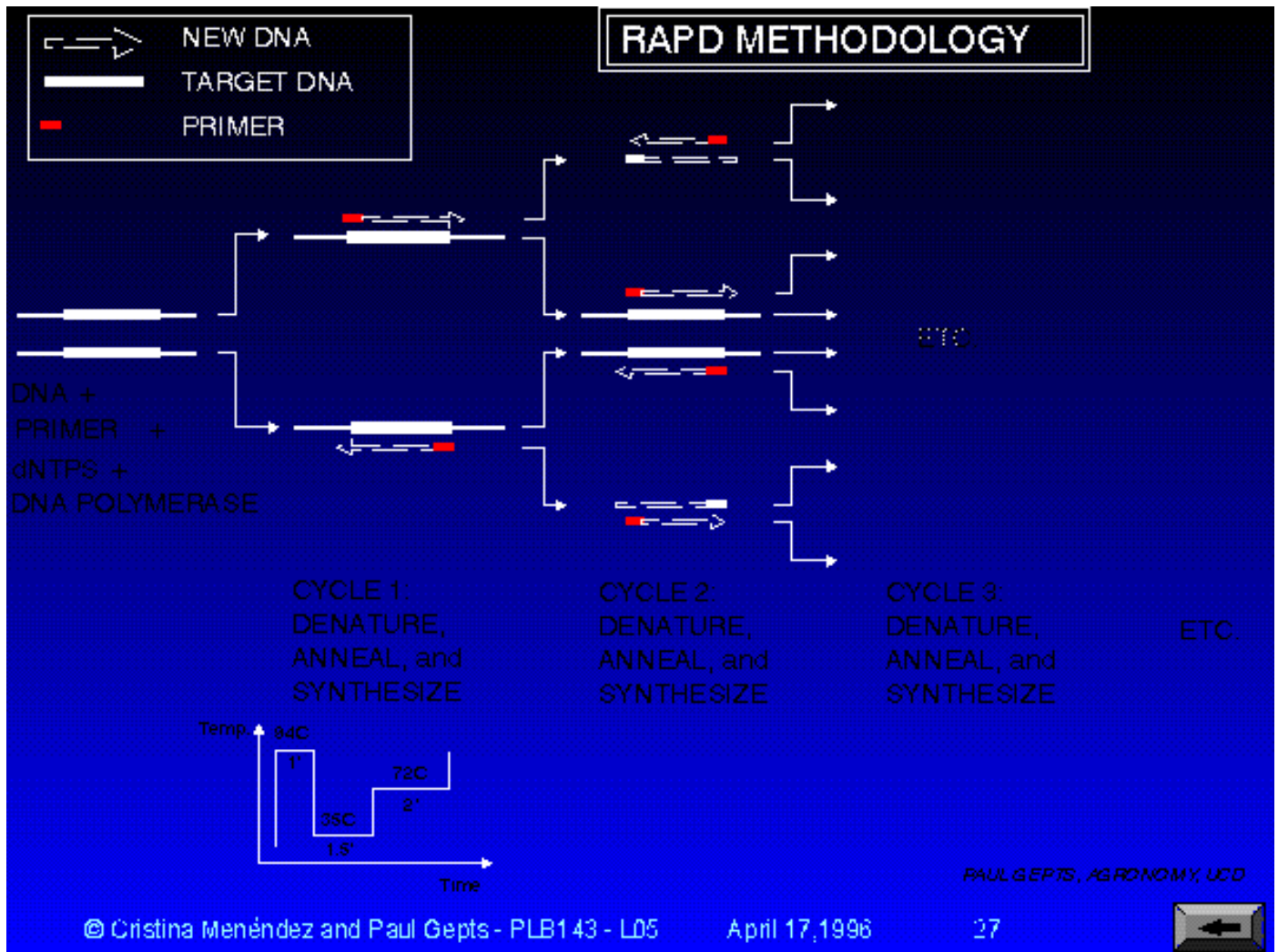
Nevýhodou je již zmiňovaná nemožnost odlišit heterozygota od dominantního homozygota. Komplikaci také představuje omezená použitelnost RAPD pro řešení otázek na úrovni vyšší než druhové, například stanovení příbuznosti v rámci rodu. Fakt, že dva fragmenty putují na gelu stejnou rychlostí (komigrují), nelze automaticky brát jako důkaz jejich homologie. Může se jednat o stejně velké fragmenty pocházející z naprosto odlišných oblastí genomu. Tyto nevýhody však nijak neomezují použití RAPD markerů pro studie genetické variability populací (RUSSEL et al., 1993).

Informativní charakter RAPD markerů lze zvýšit další modifikací, kterou umožňuje metoda RAMPO (Random Amplified Microsatellite Polymorphism). V první fázi je genomová DNA amplifikována pomocí jednoho náhodného primeru nebo pomocí dvojice primerů komplementárních k sekvenci mikrosatelitů. Po elektroforetické separaci produktu

amplifikace a jeho přenesení na membránu se provádí hybridizace se značenou mikrosatelitovou sondou.

DAF (DNA Amplification Fingerprinting) je modifikovaná RAPD. Na rozdíl od RAPD je produkt PCR separován v polyakrylamidovém gelu a vizualizován po barvení stříbrem. Primery jsou až 5 nukleotidů dlouhé a vytváří komplexní spektrum. Aplikace metody je vhodná především pro získání genomového otisku (tzv. fingerprint) (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001).

Obr. 2.4. Metoda RAPD:



(<http://www.plantsciences.ucdavis.edu/gepts/pb143/lec05/RAPD.GIF>)

2.4.2.4. AFLP

Metoda AFLP – (Amplified Fragment Length Polymorphisms) kombinuje postupy jak RFLP tak PCR. Uskutečňuje se v několika krocích a je založena na detekci fragmentů DNA získaných štěpením restričními endonukleázami prostřednictvím PCR amplifikace (obr. 2.5).

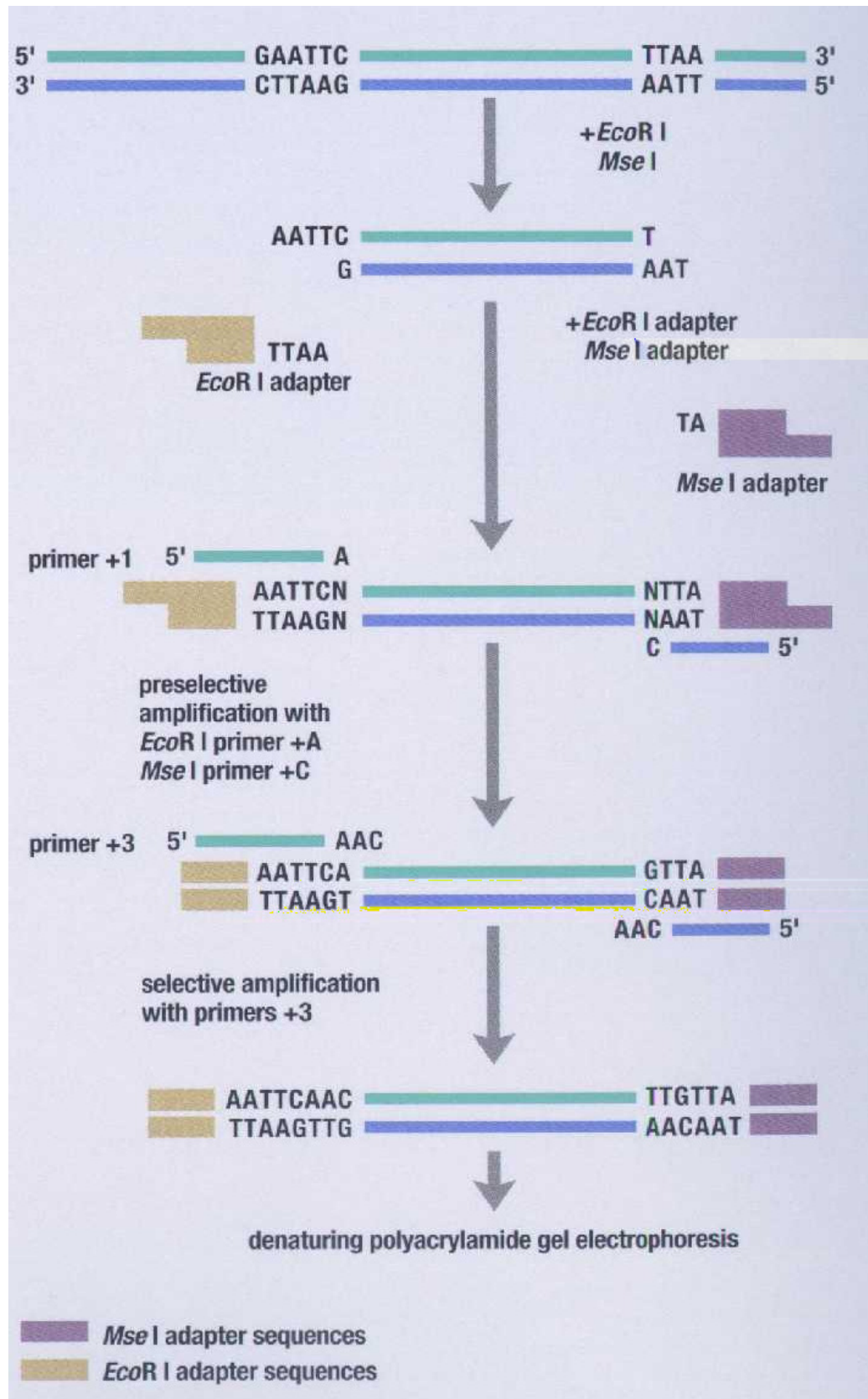
- V prvním kroku se provede **štěpení rostlinné genomové DNA** restričními endonukleázami. Používají se dvě, často a vzácně štěpící rostlinnou DNA, například EcoRI a MseI.
- V dalším kroku se provádí **ligace adaptorů**, což jsou krátké většinou radioaktivně značené oligonukleotidy, které jsou komplementární k vytvořeným restričním místům rostlinné DNA.
- Dále se provede **amplifikace fragmentů s primery**, které se komplementárně vážou na sekvence adaptorů a sousední selektivní nukleotidy.
- V posledním kroku se provede **elektroforéza** v polyakrylamidovém gelu a autoradiografie.

Spektrum fragmentů je možné získat bez předcházející znalosti sekvence a počet fragmentů detekovaných v jedné reakci je „vyladěn“ sadami specifických primerů. Metoda je vhodná především k detekci polymorfizmu u blízce příbuzných genotypů (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001).

Výhody a využití AFLP:

1. není nutné znát sekvenci zkoumané DNA. To je vhodné při studiu biodiverzity a genetických vzdáleností;
2. AFLP lze odečítat kodominantně, proto se hodí na genetické mapování;
3. vykazuje vysokou hustotu markerů, vhodné pro poziční klonování;
4. pomocí AFLP markerů lze provádět zároveň srovnání celkové genomové DNA i klonů genomové DNA včetně tvorby „transkripčních profilů“ při expresní analýze (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002).

Obr. 2.5. Metoda AFLP



(<http://www.msu.edu/course/mmg/835/DNAmarkers/aflp.jpg>)

2.4.2.5. Mikrosatelity

Mikrosatelity (**MS**, také **STRs** – Short Tandem Repeats nebo **SSRs** – Simple Sequence Repeats) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících se motivů o délce 1 – 6 nukleotidů (např. $(GA)_n$, $(GATA)_n$, TAUTZ, 1984). Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu (WEISING et al., 1995). Obvykle se však tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech, jelikož by měnila čtecí rámec odpovídajícího bílkovinného produktu.

Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování mikrosatelitových sekvencí, což lze pozorovat už v průběhu několika stovek generací. Další mikrosatelity se ovšem mohou snadno vyštěpit rekombinací. Zdá se ale, že některé mikrosatelitové sekvence získaly časem určitou funkci, která přispívá k jejich udržení v genomu (WEISING et al., 1995).

Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislým motivem, např. $(AG)_{24}$, u nedokonalých je tvořen několika různými motivy, např. $(AG)_{14}(AT)_{35}$ (WEBER, 1990). Oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní. Lze tedy navrhnout primery, které mohou daný mikrosatelitový marker vyhledávat. Díky malé velikosti a délkovému polymorfismu jednotlivých lokusů se screening provádí jednoduše amplifikací lokusů pomocí PCR z okrajových primerů a následnou elektroforézou. Je to metoda časově nenáročná a dají se tak hodnotit různé lokusy a velký počet vzorků najednou. Mikrosatelity jsou markery kodominantní, tak získáme od každého jedince dva typy amplifikátů. To dokazuje jejich vysokou informativnost. Nevýhodou je náročná izolace mikrosatelitových lokusů z genomu, abychom získali unikátní okolní sekvence. A však ne všechny mikrosatelity jsou informativní a snadno identifikovatelné PCR.

Tyto vysoce polymorfní markery se vyskytují ve všech eukaryotních genomech a v některých genomech prokaryot. Použitelnost SSRs jako genetických markerů je částečně limitována jejich specifitou pro určité taxony, ale bylo prokázáno, že stejné markery mohou být někdy používány pro příbuzné druhy. Mikrosatelity se staly dobrým nástrojem pro konstrukci genových map a mají také velké využití v oblasti populační genetiky a molekulární evoluce. Mikrosatelitové markery se získávají buďto prohledáváním známých sekvencí obsažených v databázích nebo izolací z různých typů DNA knihoven.

2.4.3. Techniky založené na hybridizaci DNA

2.4.3.1. RFLP

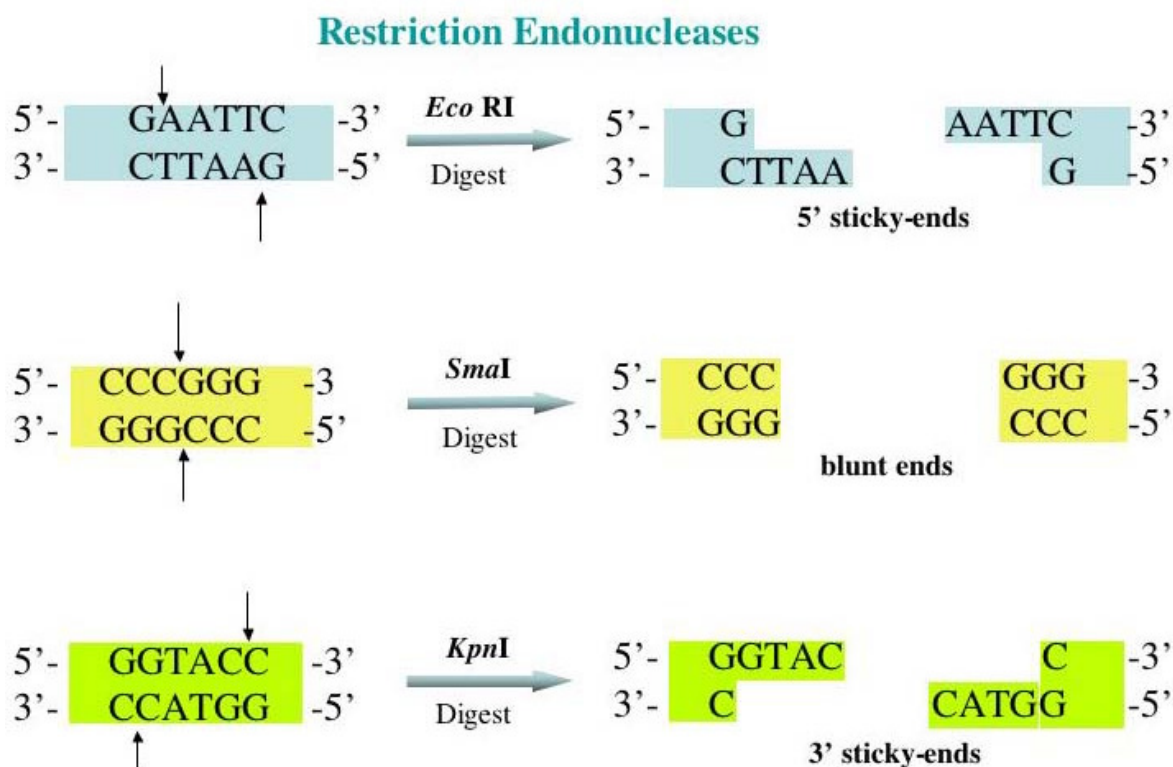
RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism) se používá k identifikaci alel na základě přítomnosti, nebo absence specifického restrikčního místa. Genomová DNA je štěpena příslušnou restrikční endonukleázou, separována elektroforézou na agarózovém gelu a přenesena (blotována) na pevnou membránu pomocí tzv. Southernova přenosu. Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizaci lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restrikčních fragmentů DNA (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002). RFLP markery jsou založeny na změnách v sekvencích DNA, ke kterým docházelo během evoluce. Tyto změny způsobují bodové mutace v místech štěpení restrikčními enzymy, inserce nebo delece, mohou být důsledkem nerovnoměrného crossing-overu v rámci určitého chromozomu. RFLP markery byly u rostlin poprvé použity ke konstrukci genetických map. Jsou to kodominantní markery, které umožňují určit, zda je vázaný znak přítomen u určitého jedince v homozygotním nebo heterozygotním stavu (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001).

Velkou výhodou metody RFLP je, že je schopna identifikovat polymorfismus i uvnitř markerů typu I, když je jako sonda použita komplementární DNA (cDNA). Metoda je vhodná pro vazbové i komparativní mapování a odhalení variability v kandidátních genech pro ekonomicky významné znaky (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002). Nevýhodou je vysoká výchozí koncentrace DNA potřebná pro restrikční štěpení a Southernovu hybridizaci. Také radioaktivní značení sondy přináší určitá rizika. Byla však již vypracována řada neradioaktivních metod značení sondy. Analýza je časově dosti náročná a pracná a jen několik markerů má polymorfní charakter, což je nevýhodné především u blízce příbuzných druhů (ŘEPKOVÁ, RELICHOVÁ, 2001). Vzhledem k relativní pracnosti metody se dnes dává přednost její modifikaci vzniklé spojením s PCR (PCR-RFLP).

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které se specificky vážou na DNA a štěpí ji ve specifických místech nacházejících se uvnitř, nebo blízko rozpoznávací sekvence. Tyto enzymy jsou rozděleny do tří skupin: endonukleázy typu I, II a III. Endonukleázy typu I a III nemají přesnou polohu štěpení vzhledem k rozpoznávací sekvenci a proto se běžně nepoužívají. V molekulární genetice se používají endonukleázy typu II, které štěpí vždy ve

stejném místě, které se nachází v rozpoznávací sekvenci a nebo v její těsné blízkosti. Rozpoznávací sekvence jsou dlouhé čtyři, pět, nebo šest nukleotidů a jsou oboustranně symetrické (palindrom). Je jich známo kolem 3000 a tvoří 250 různých restričních míst. Některé restriční endonukleázy mohou mít i delší nebo degenerované rozpoznávací sekvence (rozpoznávají více různých nukleotidů). Restriční enzymy štěpí DNA dvěma způsoby (obr. 2.6): rozštěpí obě vlákna ve stejném místě (tvoří tzv. tupé konce – blunt ends) nebo štěpí každé vlákno v jiné poloze (tvoří tzv. kohezní nebo-li lepidivé konce – sticky-ends) (KNOLL, VYKOUKALOVÁ, 2002).

Obr. 2.6. Možnosti štěpení restričními endonukleázami



(<http://www.langara.bc.ca/biology/mario/Biol2315notes/biol2315chap13.html>)

2.5. Sekvenování

Tato metoda slouží k přesnému určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA nebo RNA. Je nejpřesnějším, však pracovně nejnáročnějším, nejsložitějším a nejdražším způsobem studia DNA, při kterém se určuje přesné pořadí bází v určitém úseku DNA.

Pro sekvenování DNA byly vyvinuty dvě metody:

- 1) **Sangerova metoda** (1977) – tato metoda využívá syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázami *in vitro*, ukončované náhodně v místě jednotlivých bází (SANGER, COULSON, 1977) (obr. 2.7. Příloha).
- 2) **Maxam-Gilbertova metoda** (1977) – při této metodě dochází k chemickému štěpení DNA v místě určitých bází (MAXAM, GILBERT, 1997) (obr. 2.8. Příloha).

Nejčastěji se používá Sangerova metoda, také nazývána dideoxy sekvenování. Sekvenovaný úsek DNA, např. klonovaný fragment nebo produkt polymerázové řetězové reakce se rozdělí do čtyř částí, do každé z těchto částí se přidají všechny volné deoxynukleotidy a pak odděleně do každé z částí jen po jedné z jejich dideoxy variant: ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP, kterým chybí 3'-OH skupina. Reakci enzymaticky zajišťuje některá z DNA polymeráz (ŘEHOUT et al., 2000). V této metodě, je jednovláknová (ss) DNA osekvenována a slouží jako templát pro *in vitro* DNA syntézu. Synteticky značený 5'-konec oligodeoxynukleotidu se používá jako primer. Sekvenovaný úsek DNA se rozdělí do čtyř částí a každá část obsahuje nízkou koncentraci dideoxynukleotid trifosfátů (ddNTP) (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) a navíc k tomu vyšší koncentraci volných deoxynukleotidů. V každé reakci je ddNTP náhodně připojen v pozici k odpovídajícímu deoxynukleotidu (dNTP). Přidání ddNTP ukončí polymeraci, protože nepřítomnost 3'-OH skupiny předejde přidání dalšího nukleotidu. Směs zakončených fragmentů se rozdělí souběžně na gelové elektroforéze. Oddělené fragmenty jsou detekovány autoradiograficky (LODISH et al., 2005).

Sangerova metoda se používá častěji než metoda Maxam-Gilbertova, protože se dá touto metodou sekvenovat úsek o délce 500 – 800 kb. Její nevýhodou je, že při čtení sekvence nečteme sekvenci původní DNA, ale sekvenci k ní komplementární.

Maxam-Gilbertova metoda využívá toho, že čtyři vzorky DNA jsou restriktivně štěpeny a vystaveny různým chemickým reakcím, které selektivně štěpí DNA v různých specifických nukleotidech. DNA je na svých koncích značená. Získané fragmenty jsou odděleny gelovou elektroforézou a pouze koncově značená vlákna jsou následně vizualizována autoradiograficky. Sekvence původního koncově značeného restriktivního fragmentu může být stanovena přímo z paralelní elektroforézy čtyř jednotlivých reakcí (LODISH et al., 2005).

Důvod, proč se této metody moc nevyužívá je několik, z nichž lze uvést například nutnost používání radioaktivně značených konců, přinášející vysokou úroveň radioaktivity. Sekvenování celých genomů musí být nutně spojeno s vytvářením molekulárně genomových databází, které umožňují uchovávat, organizovat a zpřístupňovat sekvenční data, porovnávat tak sekvence celého genomu s již dříve zjištěnými sekvencemi jednotlivých genů jiných organismů se známou funkcí. Tím je umožněno přiřadit nově získaným, zatím neznámým sekvencím pravděpodobné funkce. V současné době byly sekvenovány genomy četných mikroorganismů. Z eukaryotních genomů bylo dokonce roku 2000 sekvenování dokončeno u genomu kvasinky, hlístice, octomilky a v neposlední řadě i u genomu člověka (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002).

2.6. Klonování

Pod pojmem klonování si lze představit jakýkoliv děj, při němž se z jedné předlohy vytváří více kopií. Formou přirozeného klonování je vegetativní rozmnožování rostlin a vznik jednovaječných dvojčat (KOČÁREK, 2004). Pro mnoho aplikací technologie DNA je nutné naklonovat (vytvořit identické kopie) úsek DNA, většinou gen. To lze udělat několika způsoby nejjednodušší je namnožit požadovaný úsek v rychle se dělících bakteriích, kdy je při každé replikaci bakteriální DNA zkopírována i naše DNA. Aby se cizorodá DNA v bakteriální buňce udržela, je pro její amplifikaci využit nosič neboli vektor, kterým je bakteriální plazmid nebo virový genom. Typický plazmidový klonovací vektor je relativně malá kruhová molekula DNA o délce několika tisíc nukleotidových párů, která se může replikovat uvnitř bakterie. Plazmidový vektor musí obsahovat replikační počátek, který umožňuje replikaci plazmidu nezávisle na bakteriálním chromozomu. Dalším požadavkem je přítomnost místa rozpoznávaného restriktivní

endonukleázou, aby mohl být plazmid rozpojen a do vzniklé mezery vložen cizorodý fragment DNA. Plazmidy obvykle obsahují také gen pro nějakou rozlišitelnou vlastnost, většinou rezistenci k antibiotikům, která umožňuje přímou identifikaci bakterií obsahující tento plastid. (ALBERTS et al., 2005).

Výhodou této metody je rychlost, malá chybovost a velké množství amplifikovaného úseku DNA.

Při klonování DNA geonomu mají pokusy dvě základní etapy:

Na základě izolované specifické mRNA se pomocí reverzní transkriptázy a DNA polymerázy odvodí cDNA a vloží se do vektoru (zpravidla bakteriálního plazmidu).

Vytvoření genové banky rostlinné geonomové DNA a hybridizací s cDNA inzerované ve vektoru se v ní vyhledávají příslušné klonované geny (ONDŘEJ, 1985).

2.6.1. Klonovací vektory

Klonovací vektory musí splňovat tyto podmínky:

- Mají počátek replikace k zajištění jejich replikace v hostitelské buňce.
- Musí obsahovat minimálně jeden selektovatelný markerový gen.
- Mají jedno, nebo více unikátních restrikčních míst (BŘÍZA, cit. 2006–11-28).

2.6.1.1. Plazmidy

Plazmidy jsou kruhové, dvouvláknové DNA (dsDNA) molekuly, které jsou odděleny od buněčné chromozomální DNA (LODISH et al., 2005). Některé z nich jsou přítomny v buňce v mnoha kopiích (relaxed plasmids, replikačně neomezené, 10 – 200 kopií), některé naopak v jedné nebo několika (stringent plasmids, replikačně omezené); nesou geny, které nejsou pro bakterii esenciální, ale které jí dávají selekční výhodu.

Často je to sdružená rezistence k několika antibiotikům (rezistenci kódující plazmidy, R-plazmidy). Jiné plazmidy (Col-plazmidy bakterie *E. coli*) produkují toxiny, které jsou toxické pro bakterie dalších kmenů téhož druhu (kolciny) (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002).

Plazmidy mají vlastní počátek replikace – replikují se nezávisle na bakteriálním chromozomu (BŘÍZA, 2006). Plazmidy mohou být velké od několika tisíc párů bází (bp)

až více než 100 kilobází (kb). Stejně jako chromozomální DNA je plazmidová DNA kopírována před každým buněčným dělením.

Tyto plazmidy byly upraveny a zkonstruovány pro použití jako vektory v DNA klonování. Plazmidy nejběžněji užívané v rekombinantních DNA technologiích se kopírují v *E. coli* (LODISH et al., 2005).

Ti-plazmidy bakterií *Agrobacterium tumefaciens* se skládají se ze dvou základních částí: části T-DNA (transferred DNA), která se konstantně včleňuje do rostlinných buněk na základě bakteriálního procesu, jehož velká část je kódována plazmidovou DNA a části, která se uplatňuje v bakteriích. Část, která se uplatňuje v bakteriích, má počátek replikace, jenž se uplatňuje jak v *E. coli*, tak v *A. tumefaciens*. Úpravy plazmidů, manipulace *in vitro*, se provádějí v bakteriích *E. coli*. Spočívají zpravidla v tom, že do T-DNA výchozího vektorového plazmidu se včlení gen, který chceme přenést do rostlin. Plazmid má v T-DNA zpravidla tzv. polylinkerovou sekvenci (multiple cloning site). To je syntetická sekvence DNA, která se skládá z cílových míst pro mnoho restričních endonukleáz uspořádaných za sebou. Jsou to taková cílová místa pro konkrétní restriční endonukleázy, která jinde na plazmidu nejsou (unikátní místa).

Gen, který se má včlenit do rostlin, se vyštěpí z ostatní DNA některým z restričních enzymů. Velikost cizorodé DNA se přibližně pohybuje maximálně do 15 kb. Stejným restričním enzymem se rozštěpí v polylinkerovém úseku také vektorový plazmid a gen se včlení ligací do plazmidu. Plazmid se pak transformací vpraví do buněk *E. coli*. Buňky s plazmidem se vyselektují a plazmid se v nich nechá namnožit. Poté se znovu izoluje, rozštěpí restričními endonukleázami a ověří, že má předpokládanou strukturu. Pokud ano, pak se z buněk *E. coli* přenesou do *A. tumefaciens*. Tento přenos se zpravidla děje bakteriální konjugací, případně transformací. V části, která se uplatňuje v bakteriích, musí být bakteriální (obsahující bakteriální regulační sekvence) gen pro rezistenci k některému antibiotiku, který se projevuje v bakteriálním genomu. Použitím tohoto antibiotika v bakteriálním médiu se selektují ty bakteriální buňky z populace buněk *E. coli* nebo *A. tumefaciens*, do kterých byl plazmid vnesen. V různých vektorech se zpravidla používá genů pro rezistenci ke kanamycinu, tetracyklinu, spektomycinu, streptomycinu (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002) chloranfenikolu, hygromycinu, nebo neomicinu.

Pravděpodobně nejpopulárnější a nejpoužívanější je komerční plazmid pBluescript, který obsahuje pro zajištění replikace sekvenci, která je rozpoznána DNA-polymerázou

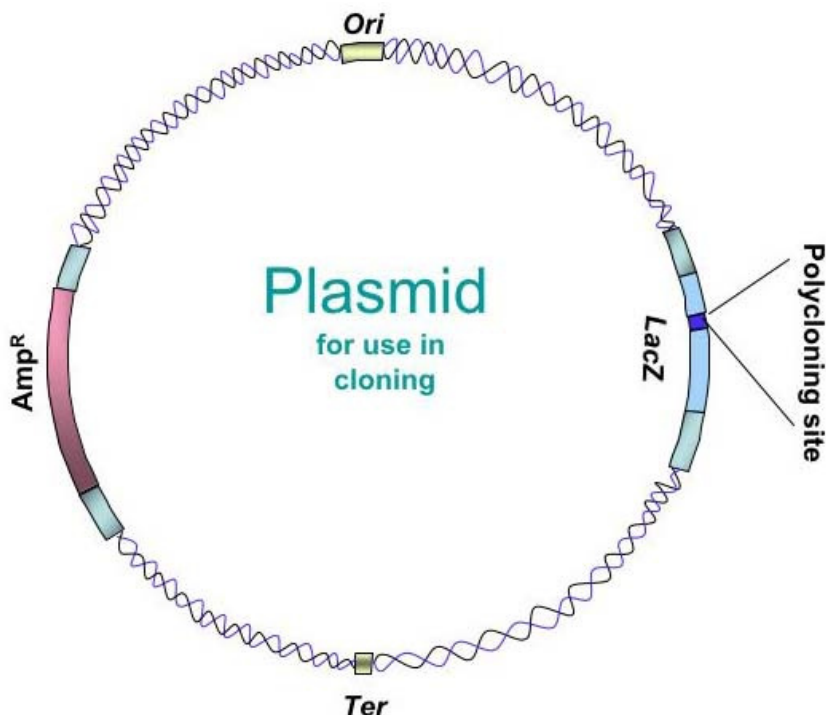
hostitelské buňky. Tato sekvence označovaná jako *ori* (z anglického „origin“ začátek replikace). V případě pBluescriptu jde o sekvenci *ColE1ori* a dále obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu (jedná se o sekvenci kódující enzym β -laktamázu. Tento enzym štěpí specificky β -laktamový kruh vyskytující se ve struktuře penicilinových antibiotik. Jelikož se k selekci z řady penicilinových antibiotik používá téměř výhradně ampicilin, získal tak označení „gen pro rezistenci k ampicilinu“).

Typickým příkladem je také pUC19, který má počátek replikace, dva selektovatelné geny a řadu unikátních restričních míst sdružených do polylinkeru. Ampicilinová rezistence je kódovaná genem *amp^R*. Gen *lacZ* kóduje β -galaktozidázu, která normálně štěpí laktózu na monosacharidy – glukózu a galaktózu který při selekci bakterií nesoucích příslušný plazmid štěpí X-gal v médiu na modrý produkt. Při transformaci plazmidem pUC19 se hledají bílé lníe rezistentní na ampicilin (BŘÍZA, cit. 2006–11-28).

Z výše uvedeného, musí tedy plazmid obsahovat (obr. 2.9):

- počátek replikace (***Ori***)
- úsek terminace (***Ter***)
- **selektivní marker** (obvykle s antibiotikovou rezistencí – např. Amp.) k selekci bakterií obsahující modifikovaný plazmid.
- **polylinkerová sekvence** – polycloning site (unikátní restriční místo sloužící k inzerci fragmentu donora)
- mnoho plazmidů umožňuje selekci na základě modro-bílého rozlišení rekombinovaných a nerekombinovaných plazmidů.
- **polylinkerová sekvence** s genem pro **β -galaktosidázu** (produkt tohoto genu způsobuje, díky ½ molekuly indiga připojené k X-gal, modré zbarvení). Inzertovaný fragment do tohoto polylinkeru tak způsobuje disfunkci genu a jeho produktu čemuž odpovídá následné mléčné zbarvení bakteriální kolonie.

Obr. 2.9. Příklad plazmidu použitelného ke klonování



(<http://www.langara.bc.ca/biology/mario/Biol2430notes/biol2430chap16.html>)

2.6.1.2. Bakteriofágy

DNA bakteriofágů se v baktériích množí obvykle ještě rychleji než DNA plazmidů a dá se také použít jako vektor cizorodé DNA. Využití bakteriofágů je ale problematické ze dvou důvodů: manipulace s nimi je obvykle obtížnější, protože jsou samostatnější než plazmidy a proto mívají větší a složitější genomy. Téměř všechny geny bývají nezbytné pro životaschopnost a velmi nahuštěné, aby se genom vešel do co nejmenší a tedy nejstabilnější kapsidy. Velmi těžko se pak hledá prostor pro cizorodou DNA.

Bakteriofágy, označované také jako bakteriální viry, se skládají z DNA a fágového pouzdra, v některých případech obsahují i další proteiny. Většina bakteriofágů má dvojí životní cyklus: lyzogenní a lytický.

Při lyzogenním buněčném cyklu se bakteriofágová částice usadí na povrchu bakterie a vstříkne svou DNA dovnitř buňky. V bakteriální buňce se fágová DNA začlení do specifického místa bakteriálního chromozomu a bakteriofág se tak stane součástí bakteriálního chromozomu, se kterým se společně reprodukuje. Po čase dochází náhodně, nebo vlivem různých vnějších faktorů (zvýšená teplota, UV-záření) k vystřížení fága

z bakteriálního chromozomu. Ten se poté v bakteriální buňce množí a za krátko vyplní celou buňku, která se následně rozpadá.

Při lytickém cyklu přisedne bakteriofág a bezprostředně poté dochází k lyzi buňky (ONDŘEJ, DROBNÍK, 2002).

Ve speciálních případech ale mohou být bakteriofágové vektory pro klonování výhodné díky velké rozmanitosti bakteriofágových funkcí.

Bakteriofág λ . Schopnosti tohoto fága poprvé objevil na počátku padesátých let dvacátého století André Lwoff u hostitelských buněk *E. coli*. Bakteriofág λ má schopnost lýzy, kdy se bakteriofág namnoží asi na 100 partikulí a poté se buňka rozpadne, nebo lysogenizace, kdy se jeho DNA integruje do chromozomu bakterie v určitém místě a dále se s ním replikuje. Rozhodnutí, zda dojde k lyzi, nebo lysogenizaci závisí na aktivitě cII proteinu. Uvnitř fága je obsažena lineární DNA o délce 48 502 bp. Krajních 12 bazí na 5' a 3' konci λ genomu je jednořetězcových. Tyto konce se označují jako kohezivní, nebo-li *cos* místa, jsou komplementární a mohou být vzájemně ligovány bakteriální ligázou do cirkularizované formy dsDNA molekuly.

Příslušné funkční geny bakteriofága λ jsou většinou seskupeny v genomu společně, vyjma dvou pozitivních regulačních genů N a Q. Geny na levé straně konvenční genové mapy kódují hlavu a část fágových proteinových partikulí. Tyto obsažené geny a jejich příslušné proteinové produkty jsou za pomoci rekombinace a lyzogenického procesu inzertovány v podobě cirkularizovaného fágového chromozomu do hostitelského chromozomu bakterie a dochází tak k jejich stabilní replikaci. Pravá strana mapy obsahuje geny týkající se regulace transkripce a schopnosti profága k nové infekci (*N*, *cro*, *cI*), dále geny pro DNA syntézu, pozdní regulační funkci (Q) a lýzu hostitelské buňky (REECE, 2004).

Po nahromadění fágových strukturních proteinů se samovolně složí zvlášť hlavičky a ocásky fága. Do hlav se navine konkatemerní DNA a v *cos* místě je vždy DNA po jedné délce genomu uštěržena A proteinem za tvorby 12b kohezivních konců. Poté dojde k připojení ocásku a vzniká tak infekční partikule. Podle VLASÁKA (cit. 2006-11-26) dojde k připojení ocásku pouze v případě, že je v hlavičce navinuta DNA v množství mezi 78% – 105% normálního genomu. Zmenšené vektory tedy nesmí být menší, než 78% (jinak je nelze množit) a s integrovanou cizorodou DNA nad 105%.

2.6.1.3. Kosmidy

Kosmidy říkáme malým plazmidům (~ 5kb), do kterých bylo přidáno *cos* místo z λ -bakteriofága HOHNOVÁ, 1978, COLLINS, BRÜNING, 1978). Pokud jsou *cos* místa ve vhodné vzdálenosti a to v rozmezí přibližně 37 – 51 kbp, lze za pomoci unikátního restrikčního enzymu naligovat do specifického místa fragment DNA. Takto upravená lineární DNA je injikována do bakterií a následně cirkularizována pomocí komplementárních *cos* konců. DNA je udržována v bakteriích *E. coli* ve formě plazmidu a následně se replikuje z plazmidového počátku replikace. U kosmidů lze tedy zaklonovat až 47 kbp velký genomový fragment což představuje podstatně víc, než může být klonováno do samotných lambdových vektorů.

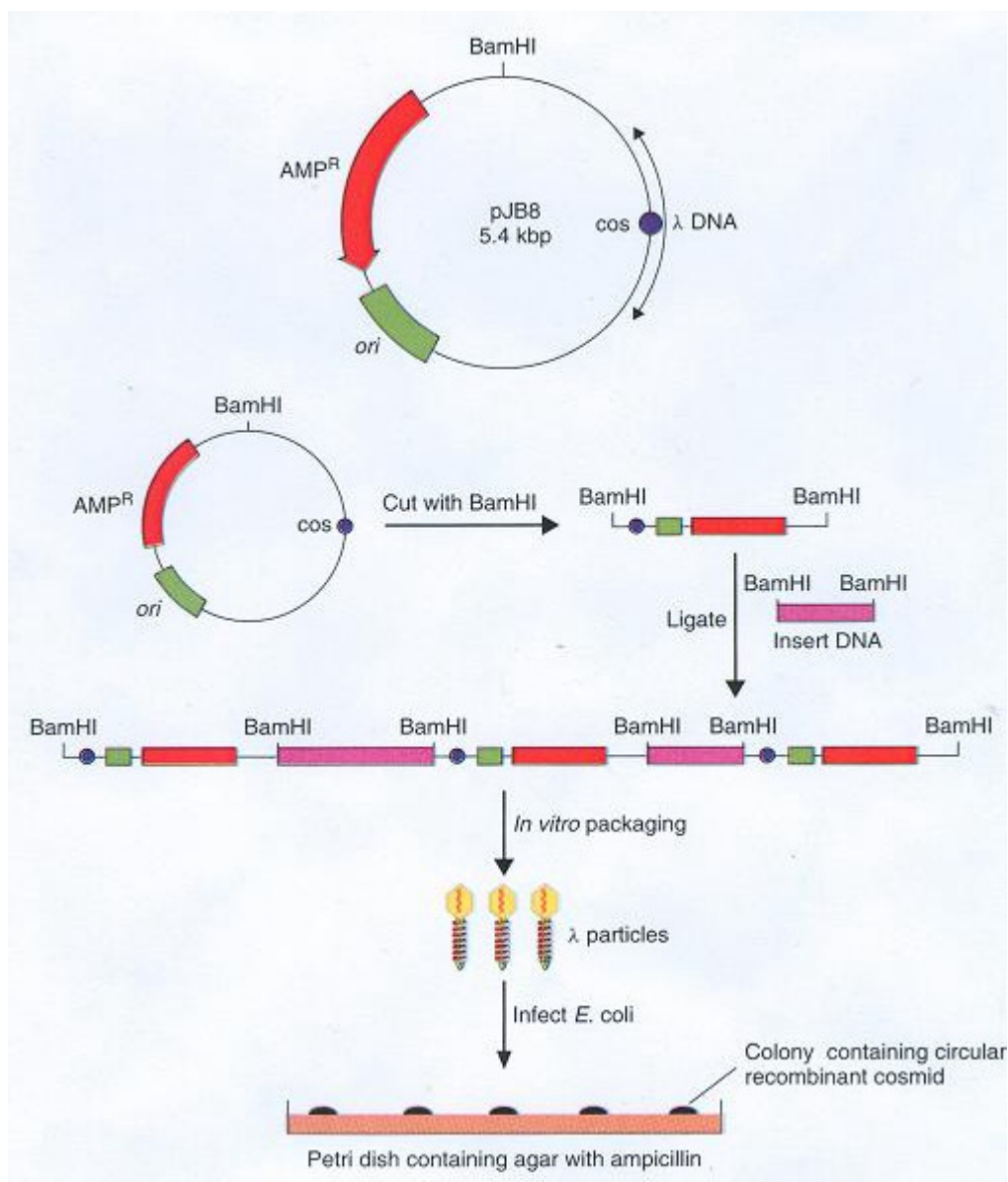
Kosmidy jsou stejně jako plazmidy velmi stabilní, ale inserce dlouhých fragmentů DNA může způsobovat potíže při udržení rekombinantních kosmidů uvnitř bakteriálních buněk. Nejproblematictější je však při práci s kosmidy produkce lineární DNA s naligovaným fragmentem genomové DNA, kde dochází u kozmidu a inzertu k tvorbě konkatemerů. Existují zde základní dva problémy:

Při ligaci inzertu DNA do kosmidu vzniká cirkulární molekula DNA, která není schopna účastnit se inserce *in vitro*.

Může dojít ke zaligování více, než jedné inzertní molekuly DNA mezi každý fragment DNA kozmidu. To může způsobovat falešnou představu o uspořádání inzertu v DNA.

Tyto problémy mohou být překonány sestřihem kosmidů dvěma restrikčními enzymy k vytvoření levého a pravého konce, kde nebude docházet k opětovné ligaci s ostatními. (ISH-HOROWICZ, BRUKE, 1981). V dnešní době se používají vektory, které mají dvě *cos* místa – snadno se pak zabrání konkatenci (spojení) prázdných vektorů, nebo vektorů s malými fragmenty i bez defosforylace (VLASÁK, cit. 2006-11-26). Vhodné ošetření inzertů DNA fosfatázou zabezpečí, že nedojde k vícenásobnému zaligování inzertů do DNA kosmidu (REECE, 2004).

Obr. 2.10. Celková stavba kosmidu a schéma inserce cizorodé DNA



Kosmidový vektor použitý ke klonování. Celková stavba kosmidového vektoru pJB8 a schéma inserce cizí DNA do kosmidu. Po odstranění ostatních λ genů je DNA inzertována do buněk *E. coli* a je udržována v podobě plazmidu a selektována na základě antibiotické rezistence (REECE, 2004).

2.6.1.4. YAC vektor

YAC (Yeast Artificial Chromosome vektor) kvasinkový umělý chromozom. Tyto vektory umožňují klonování velmi dlouhých fragmentů o několika 100 kbp v kvasinkách (BURKE et al., 1987).

Rekombinované molekuly vektorů z kvasinkových chromozomů jsou označované jako YAC s vektorovou sekvencí na konci lineárního fragmentu. Vektory obsahují centromeru, dvě telomery, vybrané geny (*Trp1*, *Ura3*) a autonomní replikační sekvenci (ARS). Schopnost replikace dlouhých fragmentů je velmi důležitá, zejména u (lidského) genomu (ERLICH et al., 1989).

Pro úplnost se zde chci zmínit o existenci dalších umělých chromozomů BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) a HAC (Human Artificial Chromosomes). Výhodou těchto chromozomů je možnost klonovat fragmenty o velikosti 600 kbp až 1 mbp.

2.6.2. Transformace plazmidů do hostitelských buněk

Transformace je nejčastější způsob, při níž jsou bakteriální buňky nejprve uvedeny do stavu kompetence, jež se navodí působením chloridu vápenatého za nízké teploty, nebo kapalným dusíkem. Kompetentní buňky jsou buňky, kterým se naruší jejich buněčná stěna a mohou přijmout cizorodou DNA. Po přidání DNA ke kompetentním buňkám a krátkém zahřátí na 42°C přechází transformující DNA do buněk. Transformované buňky se selektují na agarových plotnách obsahujících příslušné antibiotikum (ŠMARDA et al., 2005).

2.6.3. Identifikace kolonií s rekombinantní DNA

2.6.3.1. Metoda negativní selekce

Plazmid používaný ke klonování obsahuje dva geny zodpovědné za rezistenci k určitým antibiotikům, přičemž v jednom je klonovací místo. Vnesením cizorodé DNA do hostitelské buňky způsobíme inaktivaci tohoto genu a proto se buňky nesoucí plazmid stávají citlivé k tomuto antibiotiku. Buňky obsahující plazmid bez cizorodé DNA zůstávají rezistentní.

Pokud používáme např. gen rezistentní k tetracyklinu a k ampicilinu (Amp), ve kterém je klonovací místo, pak se buňky vysejí na plotny s tetracyklinem a na těchto plotnách vyrostou všechny transformované buňky. Vyrostlé kolonie obtiskneme na plotny s ampicilinem, na kterém nevyrostou buňky obsahující rekombinantní plazmid, protože gen pro Amp byl přerušen. Tyto kolonie pak vyhledáme na plotně s tetracyklinem a používáme k dalšímu množení. Nejčastěji používaným plazmidem pro negativní selekci je plazmid pBR322. Byl vytvořen z divoké *E. coli*, má ampicilinovou a tetracyklinovou rezistenci, obsahuje čtyři unikátní restrikční místa.

Při této metodě je nutné použít dokonalé značení k dohledání správné kolonie. Metoda má vysokou účinnost avšak je poněkud komplikovaná.

2.6.3.2. Metoda pozitivní selekce

Vektor nese krátký segment laktóзовého operonu *E. coli* obsahující regulační sekvence a část genu kódující β -galaktosidázu (*lacZ*), jehož expresí vzniká N-koncový fragment, označován také jako α fragment. Vektory tohoto typu jsou používány v hostitelských buňkách *E. coli*, které kódují C-koncový fragment, označovaný též zadní ω -část, β -galaktosidázy. Tyto fragmenty se mohou spojovat za vzniku enzymově aktivního proteinu. Bakterie, do nichž je přenesen vektor bez inzertu, tvoří aktivní β -galaktosidázu, jejíž tvorbu lze prokázat na plotnách s chromogenním substrátem X-gal. Jeho rozkladem β -galaktosidázou vzniká produkt zbarvující bakteriální kolonie modře. Inzerce cizorodé DNA inaktivuje N-koncový fragment enzymu a nedojde ke komplementaci a kolonie s rekombinantním plazmidem jsou pak bílé. Indukce tvorby β -galaktosidázy je zajištěna izopropyl- β -D-tiogalaktozidem (IPTG), který se přidává do živného média (ŠMARDA et al., 2005). Nejčastěji používané plazmidy jsou pUC18, pUC19 a Bluescript. Systém pozitivní selekce je rychlejší a vyžaduje jinou generaci plazmidů.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Materiál

Rostlinný materiál

Populace 1

Analýzy byly provedeny u dihaploidních linií vzniklých z F₁ kříženců AI linií a donora 00 kvality. Protože se jedná o dihaploidy, je zaručena absolutní homozygotnost. AI linie použité ke křížení pocházejí z cíleného vyhledávání rostlin, které probíhalo na pracovišti VÚOL v Opavě. Vyznačují se vysokou stabilitou AI recesivního typu (HAVEL, 1996). Pokusy o dosažení vhodné kombinace znaků AI a 00 kvality se klasickým šlechtitelským postupem ukázaly jako neúspěšné (AI se v následných generacích vytrácela). Z tohoto důvodu byly na pracovišti VÚRV Praha – Ruzyně vyprodukovány dihaploidní linie z F₁ kříženců AI linií Tandem s recesivní AI (AIK-3 a AIK-6) a donorů 00 kvality (Rasmus, OP-BN-03 a Lisek.) s cílem fixovat AI genotyp a nízký obsah glukosinolátů. Produkce dihaploidů probíhala metodou mikrosporové embryogeneze.

Tato výsledná generace F₂ (označující se jako R₁) se skládala z 118 rostlin a fenotypový projev nebyl zjišťován.

Semena jednotlivých odrůd a linií byla získána přímo ze šlechtitelských stanic v Opavě. DH linie byly vytvořeny mikrosporovou embryogenezí z AI rostlin s objektivně stanoveným stálým AI fenotypem a nízkým obsahem glukosinolátů ve VÚRV Praha - Ruzyně.

Jako rostlinný materiál byly použity dihaploidy z těchto křížení:

AIK-6 x Rasmus – rostliny 1-33

AIK-6 x OP-BN-03 – rostliny 34-66

AIK-6 x Lisek – rostliny 67-92

AIK-3 x Rasmus – rostliny 93-118

AIK-6, AIK-3 – AI linie odvozené z Tandemu 6/85

Populace 2

Analýzy byly provedeny u AI linií získaných na pracovišti VÚOL v Opavě. Tato populace se skládala z 116 rostlin u kterých byl zjišťován fenotypový projev pomocí semenného testu (tab. 4.1). Jako u populace č. 1 byly na pracovišti VÚRV Praha – Ruzyně vyprodukovány dihaploidní linie z F1 kříženců AI linií s recesivní AI (Start, Liropa, WRG 15, Tandem) a donora OO kvality (linie 2051) s cílem fixovat AI genotyp a nízký obsah glukosinolátů. Produkce dihaploidů probíhala metodou mikrosporové embryogeneze, výsledná generace se označuje jako R1 (úroveň F2 generace).

Jako rostlinný materiál byly použity dihaploidi z těchto křížení:

Start x AK linie 2051

Liropa x AK linie 2051

WRG 15 x AK linie 2051

Tandem 1/85 x AK linie 2051

OP-BN-03, Lisek, Rasmus, 2051 – donoři kvality

3.2. Metody

3.2.1. Izolace DNA z řepky olejné (*Brassica napus*)

Izolace byla prováděna pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu – Invitex dle uvedeného postupu (obr. 3.1. Příloha), z mladých listů 2 týdenních sazenic. Tato metoda je založena na principu lýzy rostlinných buněk lyzačním pufrem za přítomnosti proteinázy a následnou purifikací obsažené DNA. Čistá genomická DNA je získána postupným odstraněním ostatních buněčných komponent jako například proteinů, polysacharidů, detergentu a jiných nečistot a následným vymytím DNA elučním roztokem na povrchu speciálních mikrokolon. K DNA extrakci bylo použito přibližně 60 mg biomasy z řepkových listů v čerstvé či mražené formě, která byla po předchozím vystavení tekutému dusíku dokonale homogenizována. Vzorky získané DNA byly uchovávány při -20°C.

Při každé izolaci DNA z daných vzorků se provádí tzv. negativní kontrola izolace (blank) – čímž je ověřena čistota chemikálií od kontaminace cizí DNA během izolace.

3.2.2. PCR reakce

- Složení PCR směsi pro amplifikaci SCRII alela 2 (ŽALUDOVÁ, nepublikováno)

DNA 1 μ l

Pufr (10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 50mM KCL; 2 mM MgCl₂; 1 % Triton X-100)

Nukleotidy dNTP 2 μ l (2,5 mmol každého nukleotidu)

Pro SCR gen byly použity SCR alelově specifické oligonukleotidové primery II. třídy konstruované pro funkční alely vzniklé z AI linií Tandem určující alely 2 (5'-TTGGACTTTGACATATGTTC-3' a 5'-CTCTGAAGTGGGTTTTACAG-3') 25 pmol každého

1U Taq pol. (0,2 μ l) (TaKaRa)

Reakce byla doplněna millipore H₂O do finálního objemu 25 μ l

PCR reakce měla 45 cyklů a probíhala za těchto podmínek:

1 cyklus: denaturace při 94°C 30 vteřin

annealing při 55°C 30 vteřin

polymerace při 72°C 1 min.

- Složení PCR směsi pro amplifikaci SLGI

DNA 1 μ l

Pufr (10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 50mM KCL; 2 mM MgCl₂; 1 % Triton X-100)

Nukleotidy dNTP 3 μ l (2 nmol)

PCR byla provedena pomocí specifických SLG primerů I. třídy PS5 a PS15 (NISHIO et al.,1996)

1U Taq pol. (0,2 μ l) (TaKaRa)

Reakce byla doplněna millipore H₂O do finálního objemu 25 μ l

PCR reakce měla 35 cyklů a probíhala za těchto podmínek:

1 cyklus: denaturace při 93°C 60 vteřin

annealing při 58°C 120 vteřin

elongace při 72°C 3 min.

3.2.3. Příprava agarózového gelu

Agaróza byla připravena dle běžné metodiky v závislosti na stanoveném množství a koncentraci (viz. tab. 3.1. a 3.2.).

Tab. 3.1. Složení 1% agarózového gelu

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

Tab. 3.2. Složení 1,5% agarózového gelu

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

Zásobní roztok ethidiumbromidu (EtBr) je 1% (tj. 1 mg ethidiumbromidu ve 100 µl roztoku). Pracovní roztok získáme zředěním zásobního roztoku 10x (re)destilovanou vodou.

Složení 5 x TBE pufru:

- 54 g TRIS
- 27,5 g kyselina boritá
- 37 g EDTA
- 1000 ml H₂O pH 8,0

Postup přípravy gelu:

- všechny komponenty (vyjma EtBr) smícháme v baňce z varného skla
- dokonale rozvaříme v mikrovlnné troubě – roztok nesmí obsahovat vlákna
- baňku ochladíme přibližně na 60°C
- přidáme ethidium bromid (EtBr)
- dokonale promíchaný gel nalijeme do důkladně omyté formy s připravenými hřebeny s vhodně zvoleným počtem zubů – dle objemu a množství vzorků.
- vzniklé bubliny odstraníme směrem ke stěnám a co nejdále od slotů, do kterých budeme nanášet vzorky.

3.2.4. Elektroforéza v agarózovém gelu

Byla použita 40 cm elektroforetická vana BIO - RAD. Pufr 1x TBE ve spodní vaně. Délka pouštění elektroforézy probíhala podle potřeby, obvykle prvních 20 min při 40 V a následně 2 hodiny při napětí 90 V.

3.2.5. Semenný test

U každé rostliny byly na jednu větev s poupaty navlečeny izolátory z netkané textilie, které zde byly umístěny do odkvětu, poté byl izolátor odstraněn a větev byla označena barevným provázkem. Fenotypový projev AI byl hodnocen podle počtu semen v šešuli. Semena z AI rostlin byla získána opylením v poupěti.

Ke stanovení průkaznosti AI rostlin byla určena maximální hranice průměrného počtu semen do 6,4.

4. VÝSLEDKY

Byly použity dva markerové geny k selekci AI rostlin.

Pomocí PCR byly za použití specifických SLG-primerů I. třídy stanoveny přibližně 1300 bp velké fragmenty společně s cca 1000 bp dlouhými nespecifickými fragmenty (obr. 4.1).

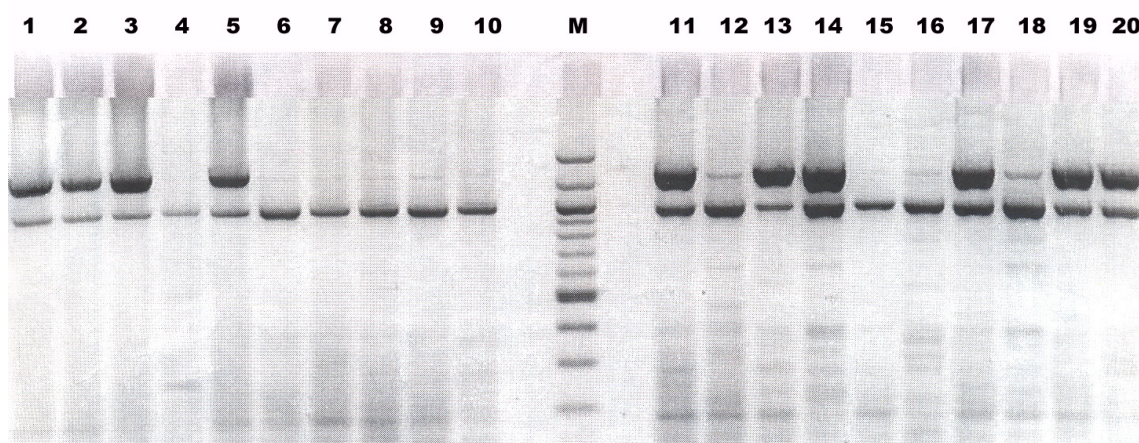
Tyto fragmenty jsou v rostlinách považované za zdroj AK. Tyto markerové geny byly detekované v širokém spektru přirozeně AK odrůd řepky, avšak ne u AI linií.

Druhý markerový systém specificky značící alely SCR genu třídy II. Tyto alely byly nalezeny u AI linií odvozených z linie Tandem. Amplifikované fragmenty genu SCR II obsahující dané alely, byly 280 bp dlouhé a typicky se vyskytující v rostlinách považovaných za AI (obr. 4.2).

Oba markerovací systémy segregují v poměru 1:1 jak jsme původně předpokládali a navíc přesně korelují s ostatními. Na základě molekulární markerové selekce dihaploidních rostlin řepky byly vybrány AI jedinci.

⇒ Selektce AK jedinců, kteří nebyly dále používány ve šlechtění:

Obr. 4.1. Příklad amplifikace genu SLG (I. třídy) Horní pruhy o délce 1300 bp byly amplifikovány u rostlin izolovaných dihaploidních populací s předpokládanou AK projevu (rostliny 1 až 20).



U populace č. 1 a č. 2 byl předpokládán štěpný poměr markerových genů 1:1 (AI:AK) (odpovídající dihaploidní populaci). U rostlin byl současně s genem SLG1 amplifikován pravděpodobně nespecifický fragment o délce 1000 bp.

SLG1 gen se amplifikoval u rostlin, které byly považovány za AK. Všechny pozitivně detekované AK rostliny byly vyloučeny z následného šlechtění. U stejných rostlin byla pokusně provedena selekce na základě amplifikace genu SCRII alely 2 (obr. 4.2).

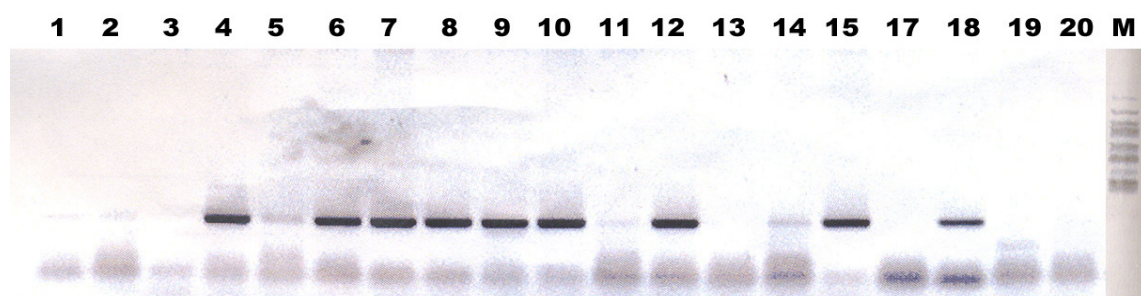
Vyhodnocení pro SLG:

Populace č. 1 určeno 62 rostlin jako AK

Populace č. 2 určeno 59 rostlin jako AK

⇒ Selektce AI jedinců, kteří byly dále používány ve šlechtění:

Obr. 4.2. Příklad amplifikace genu SCR (II třídy) V 280 bp pruhu byly amplifikovány fragmenty z rostlinek izolovaných dihaploidních populací s předpokládanou AI.



Pruhy o délce 280 bp značí AI rostliny.

Vyhodnocení PCR pro SCR:

Populace č. 1 určeno 56 rostlin jako AI

Populace č. 2 určeno 57 rostlin jako AI

Oba markerové geny spolu korespondovaly (kromě sporadického výskytu slabých, nespecifických pruhů při detekci genu SLG (I třídy)).

Tabulky 4.1. V následujících tabulkách jsou porovnány výsledky markerů s výsledky semenného testu pro konkrétní křížení Start x AK 2051; Tandem 1/85 x AK 2051; WRG 15 x AK 2051; Liropa x AK 2051 u populace č. 2.

Tab.4.1.1. AI start x AK 2051

markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu	markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu
1AK	11,3	AK	19AI	19,5	AK
2AK	9,2	AK	20AI	21,0	AK
3AK	13,7	AK	21AI	14,6	AK
4AK	21,2	AK	22AK	18,1	AK
5AI	10,8	AK	23AI	17,8	AK
7AK	34,3	AK	24AK	9,8	AK
8AK	15,5	AK	25AK	5,2	-
9AK	17,4	AK	26AK	23,5	AK
10AK	2,0	AI	27AK	30,6	AK
11AI	18,2	AK	28AK	23,9	AK
12AK	6,5	AK	29AI	0	-
14AI	4,5	AI	30AK	17,1	AK
15AI	19,2	AK	31AK	6,7	AK
16AI	23,6	AK	32AK	16,7	AK
17AK	25,6	AK	33AK	25,1	AK
18AI	16,5	AK	35AK	2,0	AI

Tab.4.1.2. AI tandem 1/85 x AK 2051

markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu	markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu
1AI	1,3	AI	10AK	17,8	AK
2AK	2,0	AI	11AK	6,7	AK
3AI	10,0	AK	12AI	9,6	AK
4AI	3,9	AI	13AI	15,8	AK
5AK	20,1	AK	14AI	9,2	AK
6AK	22,8	AK	15AI	2,3	AI
7AI	6,8	-	16AI	2,8	AI
8AK	21,6	AK	17AI	1,5	AI
9AI	11,2	AK	18AI	1,0	AI

Tab.4.1.3. AI WRG15 x AK 2051

markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu	markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu
1AK	25,9	AK	6AK	26,7	AK
2AK	7,6	AK	7AI	9,7	AK
3AI	2,3	AI	8AI	2,1	AI
4AK	9,9	AK	9AI	1,0	AI
5AI	2,9	AI	10AI	1,0	AI

Tab.4.1.4. AI Liropa x AK 2051

markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu	markery	průměrný počet semen	reakce sem. testu
1AI	12,1	AK	29AK	19,2	AK
2AK	11,7	AK	30AK	20,6	AK
3AI	6,4	AI	31AI	5,2	-
4AK	14,7	AK	32AI	18,7	AK
5AK	28,6	AK	33AI	14,3	AK
6AK	8,5	AK	34AK	16,0	AK
7AK	22,6	AK	35AK	8,0	AK
8AI	13,1	AK	36AI	8,9	AK
9AK	15,4	AK	37AI	9,2	AK
10AK	7,3	AK	38AI	2,3	AI
11AK	1,9	AI	39AK	10,0	AK
12AK	25,9	AK	40AK	19,7	AK
13AK	3,0	AI	41AI	17,9	AK
14AI	19,6	AK	42AI	1,9	AI
15AI	11,0	AK	43AK	7,8	AK
16AI	21,2	AK	44AI	12,2	AK
17AK	9,6	AK	45AI	15,1	AK
18AI	2,0	AI	46AI	30,4	AK
19AK	5,1	-	47AK	24,2	AK
20AK	5,6	-	48AK	12,8	AK
21AI	14,0	AK	49AK	16,2	AK
22AK	6,4	-	50AI	6,5	-
23AI	4,4	AI	51AK	21,5	AK
24AK	19	AK	52AI	5,5	-
25AK	5,3	-	53AI	0,0	AI
26AK	6,3	-	55AI	1,3	AI
27AI	6,0	-	56AI	1,0	AI
28AK	24,9	AK	57AI	3,4	AI

Tabulky 4.2. Vyhodnocení semenného testu u populace č. 2.

Tab. 4.2.1. Porovnání selekce pomocí markeru a semenného testu

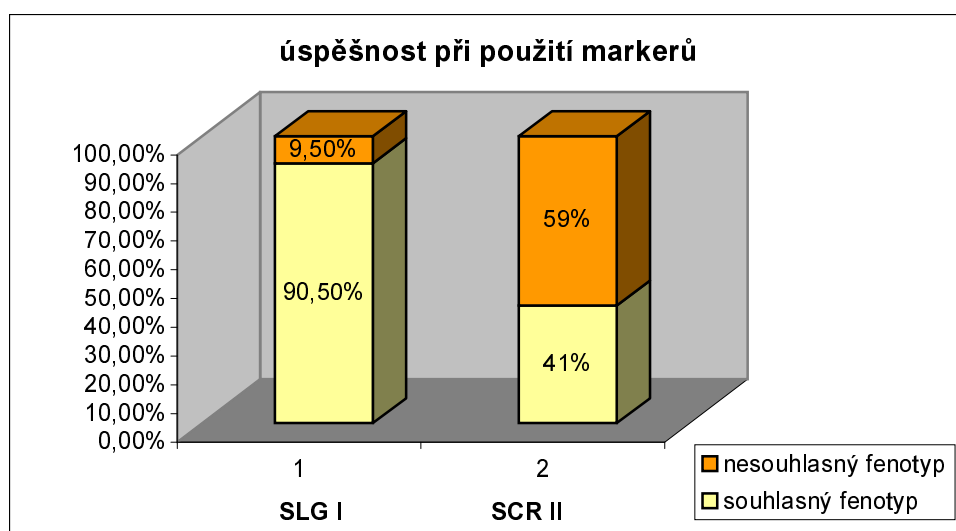
gen	selekce markerem	selekce markerem*	fenotypově souhlasilo	fenotypově nesouhlasilo	selekce fenotypem
SLGI pro AK	59 (51%)	53 (51%)	48 (46%)	5 (5%)	78 (75%)
SCRII pro AI	57 (49%)	51 (49%)	21 (20%)	30 (29%)	26 (25%)
celkem	116 (100%)	104 (100%)	69 (66%)	35 (33%)	104 (100%)

* po vyloučení indiferentních rostlin (semenným testem - 12 rostlin)

U materiálu č. 2. segregoval marker v poměru 1:1 (AI:AK), zatímco výsledky fenotypového testu ukazovaly na poměr 1:3. Při hodnocení fenotypového testu, nebyl markerový genotyp značený jako přechodný, pro zjednodušení analýzy, počítán do štěpného poměru.

Protože AI byla recesivního typu, nemohl být dominantní gen SLG třídy I amplifikován, pravděpodobně kvůli disfunkci tohoto genu, který může způsobovat AK u běžných odrůd řepky.

Graf 4.3.



S pomocí SLGI markeru byly vyloučeny AK rostliny s přesností 90,5 %, zatímco při označování AI rostlin pomocí genu SCRII byla úspěšnost jen 41%.

Tab. 4.2.2. Souhrn výsledků fenotypového testu a jejich porovnání s markery

4.1.1.				4.1.2		4.1.3		4.1.4					
1AK	AK	22AK	AK	1AI	AI	1AK	AK	1AI	AK	20AK	-	39AK	AK
2AK	AK	23AI	AK	2AK	AI	2AK	AK	2AK	AK	21AI	AK	40AK	AK
3AK	AK	24AK	AK	3AI	AK	3AI	AI	3AI	AI	22AK	-	41AI	AK
4AK	AK	25AK	-	4AI	AI	4AK	AK	4AK	AK	23AI	AI	42AI	AI
5AI	AK	26AK	AK	5AK	AK	5AI	AI	5AK	AK	24AK	AK	43AK	AK
7AK	AK	27AK	AK	6AK	AK	6AK	AK	6AK	AK	25AK	-	44AI	AK
8AK	AK	28AK	AK	7AI	-	7AI	AK	7AK	AK	26AK	-	45AI	AK
9AK	AK	29AI	-	8AK	AK	8AI	AI	8AI	AK	27AI	-	46AI	AK
10AK	AI	30AK	AK	9AI	AK	9AI	AI	9AK	AK	28AK	AK	47AK	AK
11AI	AK	31AK	AK	10AK	AK	10AI	AI	10AK	AK	29AK	AK	48AK	AK
12AK	AK	32AK	AK	11AK	AK			11AK	AI	30AK	AK	49AK	AK
14AI	AI	33AK	AK	12AI	AK			12AK	AK	31AI	-	50AI	-
15AI	AK	35AK	AI	13AI	AK			13AK	AI	32AI	AK	51AK	AK
16AI	AK			14AI	AK			14AI	AK	33AI	AK	52AI	-
17AK	AK			15AI	AI			15AI	AK	34AK	AK	53AI	AI
18AI	AK			16AI	AI			16AI	AK	35AK	AK	55AI	AI
19AI	AK			17AI	AI			17AK	AK	36AI	AK	56AI	AI
20AI	AK			18AI	AI			18AI	AI	37AI	AK	57AI	AI
21AI	AK							19AK	-	38AI	AI		

AK	AK	markery stanovená AK u SLG I byla potvrzena i fenotypově (48 vz.)
AK	AI	markery stanovená AK u SLG I nebyla potvrzena fenotypově (5 vz.)
AI	AI	markery stanovená AI u SCR II byla potvrzena i fenotypově (21 vz.)
AI	AK	markery stanovená AI u SCR II nebyla potvrzena fenotypově (30 vz.)
AK	-	markery stanovená AK u SLG I stanovena jako indiferentní (6 vz.)
AI	-	markery stanovená AI u SCR II stanovena jako indiferentní (6 vz.)

Tab. 4.2.3. Porovnání výsledků fenotypového testu dle kritérií KUČERY (1996)

4.1.1.				4.1.2		4.1.3		4.1.4					
1AK	11,3	22AK	18,1	1AI	1,3	1AK	25,9	1AI	12,1	20AK	5,6	39AK	10,0
2AK	9,2	23AI	17,8	2AK	2,0	2AK	7,6	2AK	11,7	21AI	14,0	40AK	19,7
3AK	13,7	24AK	9,8	3AI	10,0	3AI	2,3	3AI	6,4	22AK	6,4	41AI	17,9
4AK	21,2	25AK	5,2	4AI	3,9	4AK	9,9	4AK	14,7	23AI	4,4	42AI	1,9
5AI	10,8	26AK	23,5	5AK	20,1	5AI	2,9	5AK	28,6	24AK	19	43AK	7,8
7AK	34,3	27AK	30,6	6AK	22,8	6AK	26,7	6AK	8,5	25AK	5,3	44AI	12,2
8AK	15,5	28AK	23,9	7AI	6,8	7AI	9,7	7AK	22,6	26AK	6,3	45AI	15,1
9AK	17,4	29AI	0	8AK	21,6	8AI	2,1	8AI	13,1	27AI	6,0	46AI	30,4
10AK	2,0	30AK	17,1	9AI	11,2	9AI	1,0	9AK	15,4	28AK	24,9	47AK	24,2
11AI	18,2	31AK	6,7	10AK	17,8	10AI	1,0	10AK	7,3	29AK	19,2	48AK	12,8
12AK	6,5	32AK	16,7	11AK	6,7			11AK	1,9	30AK	20,6	49AK	16,2
14AI	4,5	33AK	25,1	12AI	9,6			12AK	25,9	31AI	5,2	50AI	6,5
15AI	19,2	35AK	2,0	13AI	15,8			13AK	3,0	32AI	18,7	51AK	21,5
16AI	23,6			14AI	9,2			14AI	19,6	33AI	14,3	52AI	5,5
17AK	25,6			15AI	2,3			15AI	11,0	34AK	16,0	53AI	0,0
18AI	16,5			16AI	2,8			16AI	21,2	35AK	8,0	55AI	1,3
19AI	19,5			17AI	1,5			17AK	9,6	36AI	8,9	56AI	1,0
20AI	21,0			18AI	1,0			18AI	2,0	37AI	9,2	57AI	3,4
21AI	14,6							19AK	5,1	38AI	2,3		

AK či AI	0-2	účinný AI fenotyp (do 2 semen na šesuli) (14 vz.)
AK či AI	2,1-15	výskyt částečné sterility či autosterility (2,1 – 15 sem. na šesuli) (55 vz.)
AK či AI	> 15	plně kompatibilní rostliny (46 vz.)
AI	0	tato rostlina nebyla započítávána do průměru (nevyrostla)

5. DISKUZE

U materiálu č. 1. bylo prokázáno, že gen SLG není významný při reakci rozpoznání pylového zrna na blizně u řepky. To potvrzuje i ve své studii OKAZAKI et al., 1999; SUZUKI et al., 2000; SUZUKI et al., 1999. Použitá dvojice primerů PS5 a PS15 (NISHIO et al., 1996) byla velice účinná. Přestože délka těchto primerů byla poměrně velká (23 a 27 bp), komplementární sekvence u většiny dominantních SLG genů se lišila maximálně o dvě až tři báze. Podle SOBOTKY (2001) se naopak sekvence jednoho z primerů v S-doméně SRK A10 nevyskytuje vůbec a není ani v genech příbuzných k SLG I. Gen SLG I se tak proto, jak dokazují výsledky PCR-RFLP, nebo separace na polyakrylamidovém gelu, amplifikuje velmi specificky

Složitější se zdá navrhnout primery pro specifickou amplifikaci SLG II (stejně tak jako pro S-doménu SRK). Konzervativní úseky recesivních SLG genů jsou také v SRK, SLR2 a pravděpodobně i v dalších genech jak uvádí TANTIKANJANA et al., 1996. SOBOTKA (2001) se zmiňuje o problému s dvojicí primerů PS3 a PS21, kde dochází kromě amplifikace recesivních SLG genů k amplifikaci dalších sekvencí, z nichž některé zřejmě ani nemají žádnou spojitost s S-lokusem. V případě diploidních druhů však není problém univerzálních primerů pro SLG II tak výrazný. Dochází zde k amplifikaci dvou až tří sekvencí (SLG II, SRK II, SLR2) a jednotlivé recesivní S-haplotypy jsou pomocí PCR-RFLP dobře rozlišitelné (NISHIO et al., 1996). Se zaměřením na konkrétní sekvence jednotlivých S-genů lze dojít k značnému zjednodušení práce při PCR-RFLP a ušetření práce při hledání vhodné restriční endonukleázy. Nejefektivnějším se zdá navrhnout dvojici primerů vhodných k specifické amplifikaci SLG z vybraných AI linií. Selektce na AI genotyp pak spočívá pouze v PCR reakci bez nutnosti dalšího restričního štěpení. Každý takový pár primerů je sice použitelný pouze pro jeden S-haplotyp (resp. AI linii), šlechtitelé ovšem stejně pracují pouze s několika osvědčenými S-haplotypy (SOBOTKA, 2001).

U analyzovaných AI linií došlo v našem případě u třech vzorků k amplifikaci fragmentu genu SLG I. Fragmenty se nevyskytovaly s běžnou intenzitou projevu a v porovnání s ostatními fragmenty, byl jejich výskyt detekován v podobě méně znatelných pruhů (viz. obr. 4.1 – vzorek č. 12 a 18).

Protože byly použité AI linie řepky recesivního typu u genu SCR třídy II nedošlo k předpokládanému projevu AI v rostlinách, jelikož u rostlin došlo k porušení AI projevu. Vzhledem k tomu, že SLG bílkovina není esenciální při reakci rozpoznání pylového zrna bliznou, chybějící SLG gen třídy I může nasvědčovat o jeho disfunkci, nebo absenci celého S-lokusu třídy I, které mohou být nějakým způsobem ovlivněné.

Druhou možností bylo použít jako značící marker funkční alelu nepostradatelného základního genu v AI reakci. Tento způsob předpokládal větší přesnost, než předchozí. Avšak porovnáním s prvním značícím systémem byly výsledky stejné. Nelze také vyloučit možnost, že se vyskytuje i u jiných odrůd s funkční alelou genu SCR třídy II a současně s dysfunkčním genem SLG třídy I. V tomto případě by S-lokusu třídy I obsahoval gen SLG považovaný za dominantní – ten může potlačovat funkční S-lokus s genem SCR třídy II běžně se vyskytující u AI rostlin. KUČERA (1996) ve své práci uvádí, že v R1 generaci má pouze 10 – 25 % jedinců účinný AI fenotyp (do dvou semen na šesuli). Ani ostatní rostliny však nejsou plně kompatibilní. Téměř u dvou třetin kompatibilních rostlin se podle výsledků semenného testu vyskytuje alespoň částečná sterilita či autosterilita (hodnoty semen v šesuli se pohybují v rozmezí od 5 do 15). Pokud porovnáme naše výsledky semenného testu podle hraničních hodnot stanovených KUČEROU (1996), nalezneme tak 12 % jedinců s účinným AI genotypem a 48 % rostlin s částečnou sterilitou (byly započítávány rostliny v rozmezí 2,1 – 15 semen na šesuli).

Podle všech výsledků nemusí znamenat přítomnost funkčního S-lokusu v R1 generaci křížení AI linií s kompatibilní řepkou AI fenotyp. Na základě detekce funkčního S-lokusu tedy není možné získat pouze AI linie. Část vyselektovaných rostlin bude vždy kompatibilní (nebo pouze z částečně kompatibilní). I tak má takto provedená selekce veliký význam, jelikož dojde k 50 % snížení počtu regenerantů R1 generace a v následné populaci F2 dochází dokonce k snížení o 75 % aniž by docházelo ke ztrátám jakýchkoliv AI jedinců. Tento způsob selekce představuje nezanedbatelnou úsporu času a energie, jelikož při běžném testování musí být každý jedinec pěstován do doby nasazování šesulí, musí být ošetřován, samosprašován atd. Nutno podotknout, že při následném vyhodnocení je nakonec 80% rostlinného materiálu označeno jako odpad (SOBOTKA, 2001).

Výskyt částečné sterility nemusí přímo souviset s AI reakcí. Na fenotypový projev recesivního typu AI má nejspíše vliv jeden, nebo několik modifikačních genů, které se pravděpodobně vyskytují v kompatibilní řepce a mohou na různých úrovních snižovat

účinnost AI reakce. Na expresi S-genů mohou mít vliv také mutace, jejichž vliv může zcela blokovat AI reakci (NASRALLAH et al., 1992). Mutace v lokusu S¹⁵ mohla usnadnit vznik řepky jako druhu, jelikož u čeledi *Brassicaceae* se AI reakce také uplatňuje při blokování mezidruhového opálení (HISCOCK, DICKINSON, 1993). Je tedy pravděpodobné, že je tento S-lokus u řepky od počátku nefunkční. Evoluci tohoto lokusu lze navrhnout pomocí analýzy sekvencí intronů recesivních S-genů. Také existence modifikačních genů může způsobit oslabení AI reakce bez detekovatelných změn exprese genů na S-lokusu. O významu genů, které neleží na S-lokusu, svědčí studie, podle které vykazuje účinnost AI reakce významnou variabilitu mezi různými AI liniemi se shodným S-haplotypem (RUFFIO-CHABLE, 1998).

Jak bylo již výše uvedeno, nelze vyloučit ani možnost, že zde jako modifikační gen působí některý z S-genů na dominantním S-lokusu. I když je alela S-lokusu A10 nefunkční (mutace v SRK), gen SLG a také zkrácená forma SRK se exprimují (GORING et al., 1993). Mohlo by zde tedy docházet k blokování recesivních S-haplotypů podobně jako v případě heterozygota s dominantním a recesivním S-lokusem (podstata recesivity stále není známa). Takto je možné vysvětlit jak nepřítomnost dominantního SLG u AI jedinců, tak výskyt kompatibilních jedinců bez tohoto genu.

Všeobecně se zdá být více účinná detekce pomocí markerů genu SLG třídy I, než speciálně vyvinutý marker SCR vzniklý z určitých AI linií. Vyvinutí specifických S-haplotypů může být důležité i jako prevence proti kontaminaci AI linií s různými S-alelami.

U materiálu č. 2. byl předpokládaný štěpný poměr 1:1 (AI:AK) potvrzen pomocí molekulárních markerů, zatímco pomocí fenotypového testu byl stanoven odlišně (1:3). Jako možná příčina tohoto odlišného štěpného poměru by mohla být považována existence ještě jiného lokusu ovlivňujícího AK u řepky. Pokud by se podařilo tento lokus nalézt a vytvořit vhodný molekulární marker k jeho identifikaci, bylo by možné přesněji stanovit AI a AK genotyp a umožnit tak i přesnější selekci.

Zjištěnou účinnost AI ve skleníku však nelze považovat za konečnou, neboť se velice často odlišuje od účinnosti v polních podmínkách (MARSHALL et al., 1994).

Celkové pohledy na evoluci řepky se i nadále různí. Někteří autoři jako BOHUON et al. (1996), PARKIN, LYDIATE (1997) jsou přesvědčení, že oba genomy řepky zůstaly prakticky nezměněny od doby vzniku druhu a nedošlo k vzájemné rekombinaci. Toto

tvrzení je však v rozporu s přesvědčením, že genom C je původem z jiného druhu, než z *B. oleracea* jak uvádí SONG, OSBORN (1992).

6. ZÁVĚR

K selekci autoinkompatibilních rostlin ze segregovaných dihaploidních populací řepky bylo použito dvou selekčních systémů založených na dvou markerovacích genech, které dávaly stejné výsledky. Specifické markery pro S-lokus, funkční alely genu SCR třídy II přesně korelují s univerzálními markery pro nefunkční gen SLG třídy I. Oba značící systémy mohou být použity k marker-asistované selekci u pěstovaných hybridních rostlin řepky.

V případě, že je zjištěn gen SLG třídy I, může znamenat přítomnost celého S-lokusu třídy I, který může potlačovat celý projev S-lokusu třídy II u běžných odrůd.

Výhodnějším se jeví použití genu s funkční alelou genu SCR, jejíž výskyt značí AI rostliny. Vzhledem k jeho nepostradatelnosti v reakci předpokládáme jeho větší přesnost. Použití markerového genu SLG třídy I se zdá být výhodnější, jelikož bezproblémově fungoval u všech typů křížení a zároveň tato selekce umožňuje detekci rostlin v raném stádiu ontogeneze.

7. LITERATURA

- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.** (2005) Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Espero publishing Ústí nad Labem, s. 630
- BARKOWIAK – BRODA IWONA** (1991) Studia nad systemami meskej nieplodnosciu rzepaku Br. Napus, var. eleifera. Hodowla rostlin, aklimat., nasienistvo, T 35, č. 3 – 4, s. 3 – 60
- BARSBY, T. L., A KOL.** (1987) The combination of Polima CMS and cytoplasmatic triasine resistance in Brassica napus. Teor. Appl. Gent., 73, s. 809 – 814
- BERGMANN, F.** (1975) Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica* 24: s. 175 - 177
- BOHUON, E. J. R., KEITH, D. J., PARKIN, I. A. P., SHARPE, A. G., LYDIATE, D. J.** (1996) Alignment of the conserved C genomes of *Brassica oleracea* and *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. 93: 833-839
- BOYES, D. C., NASRALLAH, J. B.** (1995) An anther-specific gene encoded by an S-locus haplotype of Brassica produces complementary and differentially regulated transcripts. Plant Cell 7: 1283 – 1294
- BRACE, J., OCKENDON, D. J., KING, G. J.** (1993) Development of a method for the ineditification of S alleles in *Brassica oleraceae* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. Sex. Plant Repord. 6: 133 – 138
- BURKE, D.T., CARLE, G.F. and OLSON, M.** (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236: 806-812
- COLLINS, J., BRÜNING, H. J.** (1978) Plasmids useable as gene-cloning vectors in an *in vitro* packaging by coliphage lambda: „cosmids“. *Gene*, 4, 85 - 107
- DIEPENBROCK, W., FISCHBECK, G., HEYLAND, K. U., KNAUER, N.** (1999) Spezieller Pflanzenbau, 3. Aufl., Eugen Ulmar, Stuttgart
- DIXIT, R., NASRALLAH, M. E., NASRALLAH, J. B.** (2000) Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase of Brassica correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in the stigmas of two Brassica strains and in transgenic tobacco plants. Plant Physiology 124: 297 – 311

- DOUGHTY, J., DIXON, S., HISCOCK, S. J., WILLIS, A. C., PARKIN, I. A. P., DOCKINSON, H. G.** (1998) PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *The Plant Cell* 10: 13333 – 1347
- ERLICH, H., A., GIBBS, R., KAZAZIAN, H., H.** (1989) Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press, s. 243
- FERRIS, P. J., GOODENOUGH, U. W.** (1994) The mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* 76: 1135 – 1145
- GIRANTON, J. L., PASSELEGUE, E., DUMAS, C., COCK, J. M., GAUDE, T.:**(1999) Membrane proteins involved in pollen-pistil interactions. *Biochimie* 81: 675 – 680
- GORING, D. R., GLAVIN, T. L., SCHAFER, U., ROTHSTEIN, S. J.** (1993) An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. *Plant Cell* 5: 531-239
- GORING, J. L., ROTHSTEIN, S. J.** (1992) The S-locus receptor kinase gene in self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *The Plant Cell* 4: 1273 – 1281
- GRAMAN, J.** (1995) Šlechtění zem. plodin. Skripta ZF JU České Budějovice: s.125
- GU, T., MAZZURCO, M., SULAMAN, W., MATIAS, D. D., GORING, D. R.** (1998) Binding of arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 382 – 387
- HAVEL, J.** (1996) Získávání autoinkompatibilních linií u řepky ozimé. *Genet. a šlecht.* 32: 9-18
- HATAKEYAMA, K., TAKASAKI, T., WATANABE, M., HINATA, K.** (1998) Molecular characterization of S-locus genes, SLG and SRK, in a pollen-recessive self-incompatibility haplotype of *Brassica rapa* L. *Genetics* 149: 1587 – 1597
- HINATA, K., WATANABE, M., YAMAKAWA, S., SATTA, Y., ISOGAI, A.** (1995) Evolutionary aspects of S-related genes of the *Brassica* self-incompatibility system: Synonymus and nonsynonymus base substitutions. *Genetics* 140: 1099 – 1104,
- HISCOCK, S. J., DICKINSON, H. G.** (1993) Unilateral incompatibility within Brassicaceae: further evidence for involvement of the self – incompatibility (S) Locus. *Theor. Appl. Genet.* 86: 744-753

- CHARLESWORTH, D., AWALDA, P.** (1998) Flowering plant self-incompatibility: the molecular population genetics of *Brassica* S-loci. *Heredity* 81: 1 – 9
- CHLOUPEK, O.** (1995) Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. ACADEMIA Praha s. 186
- CHOOKAJORN, T., KACHROO, A., RIPOLL, D. R., CLARK, A. G., NASRALLAH, J. B.** (2004) Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. *PNAS*. 4: 911 – 917
- ISH-HOROWICZ, D., BRUKE, J. F.** (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*, 9, 2989 - 2998
- JANKOVSKÝ, L., ŠMERDA, J.** (2003) Aplikace molekulární biologie v lesnictví – molekulární markery. *Lesnická práce* sv. 82, č. 1: 32 – 33
- KARP, A., EDWARDS, J.** (1997) Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature biotechnology*. 15 (7): 625-628
- KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z.** (2002) Molekulární genetika zvířat (metody detekce polymorfizmů DNA genů). MU Brno, s. 100
- KOČÁREK, E.** (2004) Genetika. SPN Praha, s. 211
- KUČERA, V., VYVADILOVÁ, M., TOMÁŠKOVÁ, D., HAVEL, J.** (1996) Segregation of specific traits in doubled haploid regenerants of winter oilseed rape. *Genet. A šlecht.* 32: 241 - 248
- KUSABA, M., NISHIO, T., SATTA, Z., HINATA, K., OCKENDON, D.** (1997) Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7673 – 7678
- LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA P., DARNELL, J.** (2000) Molecular cell biology, W. H. Freeman company, New York, USA
- MARSHALL, P., MARCHAND, M. C., LISIECZKO, Z., LANDRY, B. S.** (1994) A simple method to encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* 318: 263-267
- MAXAM, A. M., GILBERT, W.** (1997) A new method for sequencing DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 560 – 4

- NASRALLAH, M. E., KANDASAMY, M. K., NASRALLAH, J. B.** (1992) A genetically defined *trans*-acting locus regulates S-locus function in *Brassica*. *Plant J.* 2: 497 – 506
- NASRALLAH, J. B., KAO, T. H., GOLDBERG, M. L., NASRALLAH, M. E.** (1985) A cDNA clone encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleraceae*. *Nature* 318: 263 – 267
- NASRALLAH, J. B., NISHIO, T., NASRALLAH, M. E.** (1991) The self-incompatibility genes of Brassica: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 393 – 422
- NASRALLAH, J. B., NASRALLAH, M. E.** (1993) Pollen stigma signaling in the sporofytic self-incompatibility response. *The Plant Cell* roč. 5: 1325 – 1335
- NISHIO, T., KUSABA, M., WATANABE, M., HINATA, K.** (1996) Registration of S alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor. Appl. Genet.* 92: 1329-1334
- NISHIO, T., SAKOMATO, K.** (1993) PCR-RFLP of the S-locus for the identification of breeding lines in Brassica. *Jpn. J. Breed.* 43: 274
- NISHIO, T.** (1997) Self-incompatibility gene: DNA polymorphism of the S-locus in Brassica. *Gamma Field Symposia* No. 36, Institute of Radiation Breeding, Japan:45
- NOACK, J., PAULMANN, W., FRAUEN, M.** (1999) Hybridzüchtung. In: *Berichte aus der Arbeit NPZ/Lembke*, s.11
- OCKENDON, D. J.** (1974) Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open-pollinated cultivars of Brussel sprouts. *Heredity* 33: 159 – 171
- OGURA, H.** (1968) Studies on the male sterility in Japanese radish with special reference to the utilization of this male sterility towards the practical raising of hybrid seed. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, 6 (2), 39 – 78
- OKAMOTO, S., SATO, Y., SAKAMOTO, T., NISHIO, T.** (2004) Distribution of similar self-incompatibility (S) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. *Sex Plant Repord* 17: 33 – 39
- OKAZAKI, K., KUSABA, M., OCKENDON, D. J., NISHIO, T.** (1999) Characterization of S tester lines in Brassica oleraceae: polymorphism of restriction lenght of SLG homologues and isoelectric points of S-locus glycoproteins. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1329 – 1334

- ONDŘEJ, M.** (1985) Cytogenetika a molekulární genetika rostlin. ACADEMIA Praha s. 181
- ONDŘEJ, M., DROBNÍK, J.** (2002) Transgenoze rostlin. ACADEMIA Praha, s. 311
- PARKIN, U. A. P., LYDIATE, D. J.** (1997) Conserved patterns of chromosome pairing and recombination in *Brassica napus* crosses. *Genome* 40: 496-504
- PASTUGLIA, M., RUFFIO-CHABLE, V., DELORME, V., GAUDE, T., DUMAS, C., COCK, J. M.** (1997) A functional S locus anther gene is not required for the self-incompatibility response in *Brassica oleraceae*. *The Plant Cell* 9: 2065 – 2076
- REECE, R. J.** (2004) Analysis of Genes and Genomes. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 469
- RIPLEY, V. L., BEVERSDORF, W. D.** (2003) Development of self-incompatible *Brassica napus*: (III) *B. napus* genotype effects on S-allele expression. *Plant Breeding* 122: 12 – 18
- RUFFIO-CHABLE, V.** (1998) Complexity of self-incompatibility phenotype in *Brassica*: its measure and some thoughts about its genetic control. In: Proceedings of the International Symposium on Brassicas. Eds. Gregoire, T., Monteiro, A. A *Acta Horticulturae*, Leiden. P. 218 – 288
- RUSSEL, D. R., WALLACE, K. M., BATHE, J. H., MARTINELL, B. J., McCABE, D. E.** (1993) Stable transformation of *phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep.* 12: 165 – 169
- ŘEHOUT, V., ČÍTEK, J., SÁKOVÁ, L.** (2000) Genetika I. (Úvod do studia genetiky)
- ŘEPKOVÁ, J., RELICHOVÁ, J.** (2002) Genetika rostlin. MU Brno, s. 269
- SANGER, F., COULSON, A. R.** (1977) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441 – 8, 1975
- SATO, K., NISHIO, T., KIMURA, R., KUSABA, M., SUZUKI, T., HATAKEYAMA, K., OCKENDON, D. J., SATTA, J.** (2002) Coenvolution of the S-Locus Genes SRK, SLG and SP11/SCR in *Bras. oleracea* and *Bras. rapa*, *Genetics* 162: 931– 940
- SHIBA, H., IWANO. M., ENTANI, T., ISHIMITO, K., SHIMOHATO, H., CHE, F. S., SATTA, Y., ITO, A., TAKADA, Y., WATANABE, M., ISOGAI, A., TAKAYAMA, S.** (2002) The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in *Brassica* Pollen Is Regulated at the RNA Level: *The Plant Cell* 14: 491 – 504

- SHIBA, H., TAKAYAMA, S., IWANO, M., SHIMOSATO, H., FUNATO, M., NAKAGAWA, T., CHE, F. S., SUZUKI, G., WATANABE, M., HINATA, K., ISOGAI, A.** (2001) A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* sp. *Plant Physiol.* 125: 2095 – 2103
- SCHOPFER, C. R., NASRALLAH, M. E., NASRALLAH, J. B.** (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286. 1697 – 1700
- SOBOTKA, R.** (2001) Disertační práce na JCU-ZF: Analýza genu SLG a jeho využití jako selekčního markeru ve šlechtění řepky olejné, České Budějovice, s. 67
- SONG, K. M., OSBORN, T. C.** (1992) Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome* 35: 992-1001
- STEIN, J. C., HOWLET, B., BOYES, D. C., NASRALLAH, M. E., NASRALLAH, J. B.** (1991) Molecular cloning of putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleraceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8816 – 8820
- SUCHOMELOVÁ, M.** (2004) Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR. Jednotné pracovní postupy ÚKZUS, Brno, s. 24
- SUZUKI, G., KAI, N., HIROSE, T., FUKUI, K., NISHIO, T., TAKAYAMA, S., IZOGAI, A., WATANABE, M., HINATA, K.** (1999) Genomic organisation of the S-locus: identifications and characterisation of genes in SLG/SRK region of S⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391 – 400
- SUZUKI, T., KUSABA, M., MATSUSHITA, M., OKAZAKI, K., NISHIO, T.** (2000) Characterization of *Brassica* S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* 482: 102-108
- ŠIMONOVSKÝ, M.** (2001) Využití polymorfismu genu SLG pro rutinní skríníng autoinkompatibilních jedinců *Brassica napus*, Magisterská práce, 4 – 8
- ŠMARD, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPÍTKOVÁ, J.** (2005) Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita Brno, s. 188
- TANTIKANJANA, T., NASRALLAH, M. E., NASRALLAH, J. B.** (1996) The *Brassica* S gene family: molecular characterization of the SLR2 ngene. *Sex. Plant Reprod.* 9: 107 – 116
- TAUTZ, D., RENZ, M.** (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nucl. Acids Res.* 12: 4127 – 4138

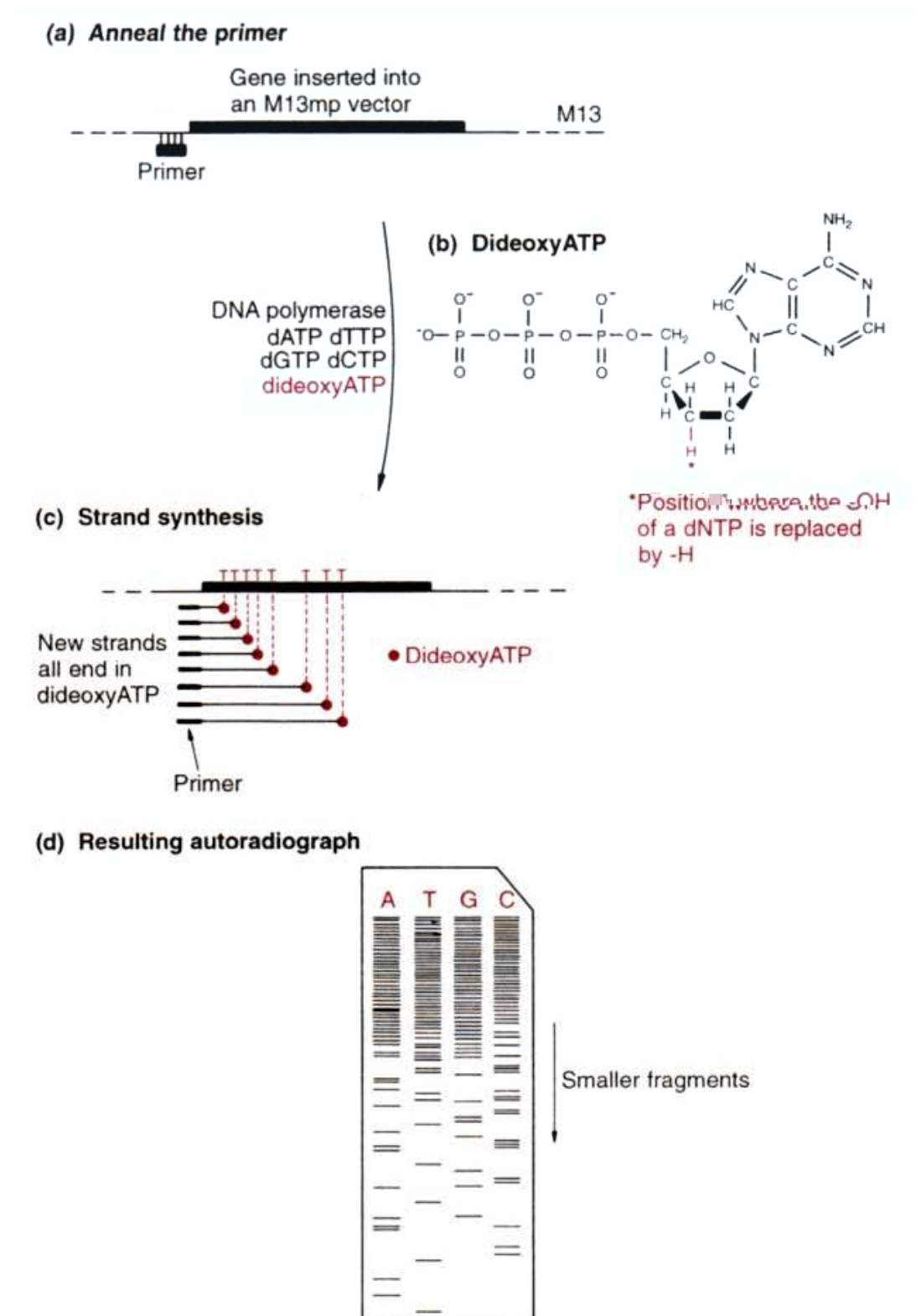
- TU, J., FU, T., ZHANG, Y., TIAN, S.** (1999) Studies on the recessive genic male sterility and its genetic markers in rapeseed (*Brassica napus* L.). Proceedings of the Tenth International Rapeseed Congress, september 26 – 29, 1999, Canberra, Australia
- WATANABE, M., ITO, A., TAKADA, Y., NINOMIYA, C., KAKIZAKI, T., TAKAHATA, Y., HATAKEYAMA, K., HINATA, K., SUZUKI, G., TAKASAKI, T., SATTA, Y., SHIBA, H., TAKAYAMA, S., IZOGAI, A.** (2000) Highly divergent sequence of pollen self-incompatibility (S) gene in class I S haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. FEBS Lett. 12: 139 – 144
- WEBER, J. L.** (1990) Informativeness of human (dC – dA) – (dG – dT)_n polymorphisms. Genomics 7: 524 – 530
- WEISING, K., NYLOM, H., WOLFF, K., MEYER, W.** (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Inc., Boca Rota, Florida

SEZNAM POUŽITÝCH ONLINE ZDROJŮ

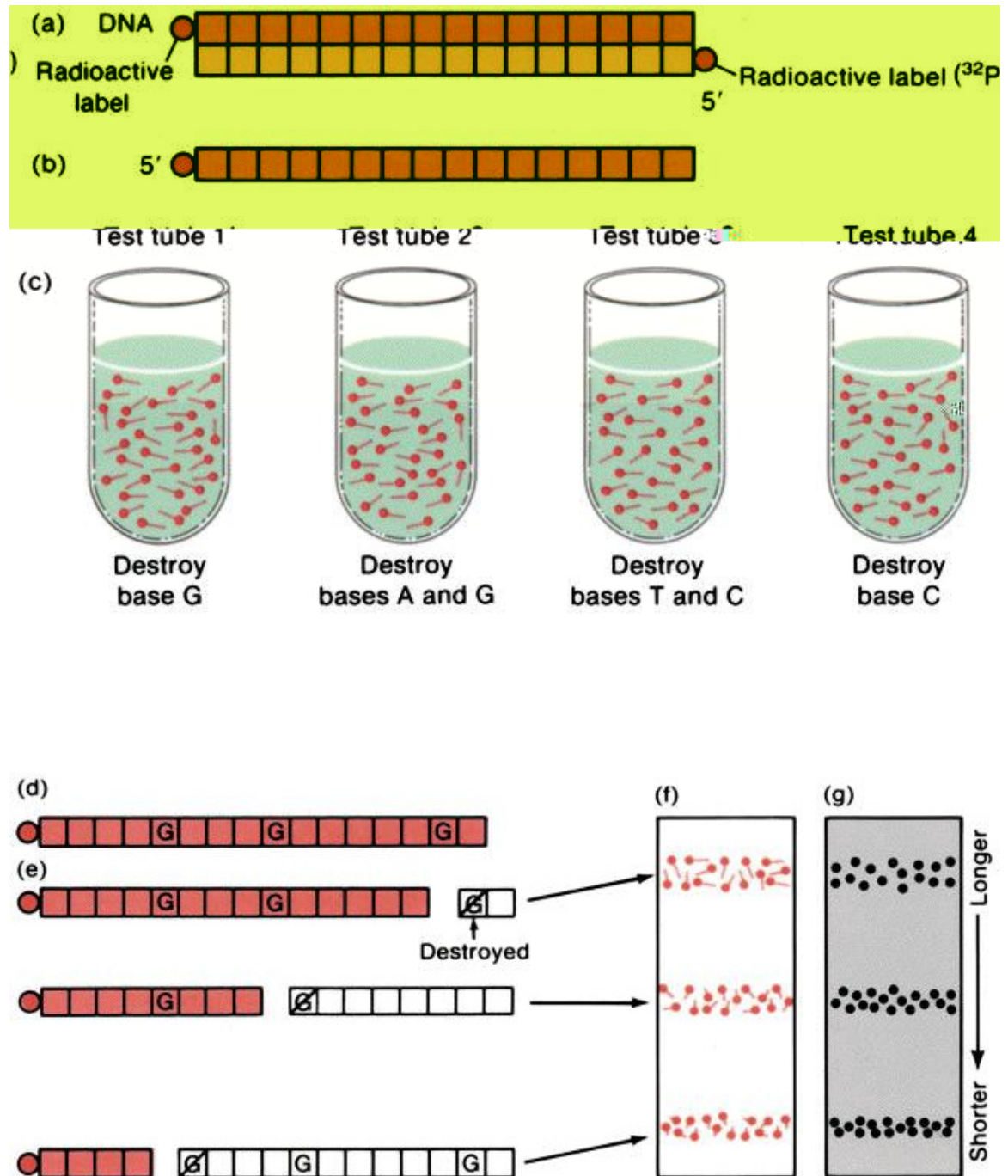
- BŘÍZA, J.** Cit. 2006-11-26. Bakteriální genetika [online]. Lekce 12 kurzu GENETIKA I, BF JU České Budějovice, dostupné na internetu:
URL<http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/240%20Genetika%20I/Lekce12_GI.pdf>.
- BŘÍZA, J.** Cit. 2006-11-28. Technologie rekombinantní DNA [online]. Lekce 1 kurzu GENETIKA II, BF JU České Budějovice, dostupné na internetu:
URL<<http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/241%20Genetika%20II/Lekce%20I.pdf>>.
- VAŠÁK, J., FÁBRY, A., ZUKALOVÁ, H., MORBACHER, J., BARANYK, P. a kol.** Cit. 2006-10-15. Systém výroby řepky [online], Česká a slovenská pěstitelská technologie ozimé řepky pro roky 1997 – 1999, Svaz pěst. a zprac.olejnin Praha, 1997, dostupné na internetu: URL<<http://max.af.czu.cz/~vlami/svr/uvod.pdf>>.
- VLASÁK, J.** Cit. 2006–11-26. Základy genového inženýrství [online]. Přednášky: Genové inženýrství – 7. Bakteriofágové a další vektory. Geonomové a c-DNA knihovny dostupné na internetu:
URL<<http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/244%20Zaklady>

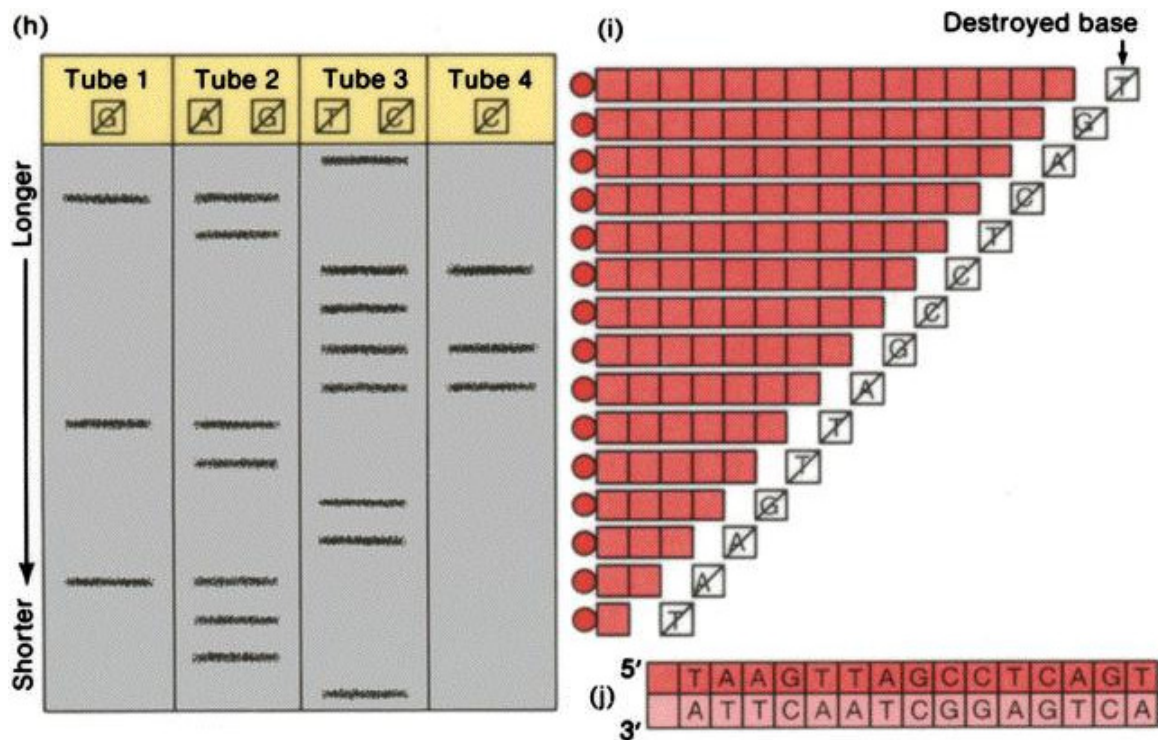
8. PŘÍLOHY

Obr. 2.7. Sekvenování • Sangerova metoda



- Maxam-Gilbertova metoda

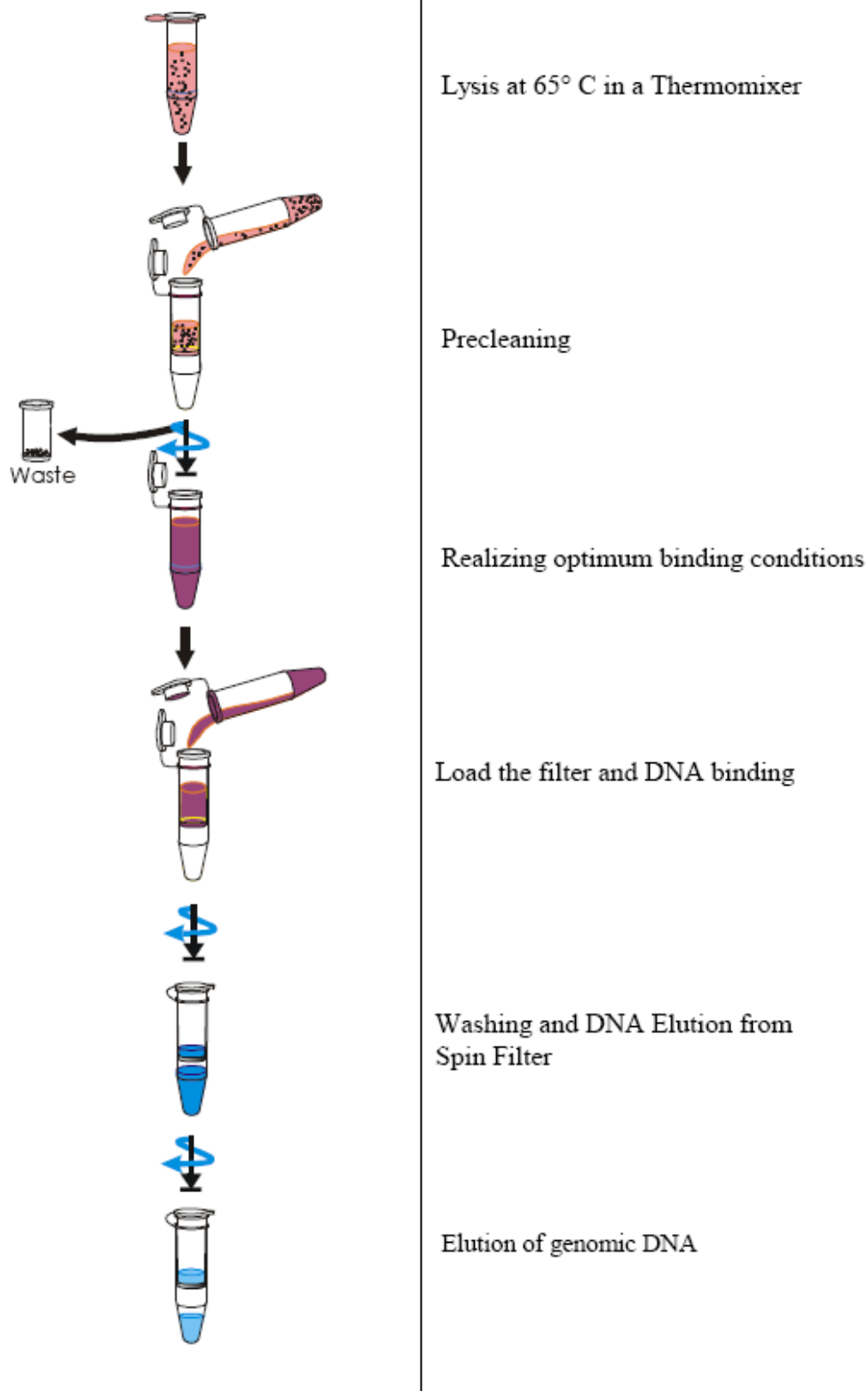




(<http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/roanoke/genetics980211.html>)

- a) radioaktivně značené konce DNA
- b) radioaktivně značené vlákno ssDNA
- c) selektivní štěpení DNA ve specifických nukleotidech
- d-j) elektroforetická separace fragmentů a následná autoradiografická vizualizace značených konců

Obr. 3.1. Izolace DNA z rostlinných tkání (Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitex)



(http://www.invitex.de/shop/pimages/ad2cab1ef0b8ca00d34e5730185e1513_Spin%20Plant%20Mini.pdf?PHPSESSID=1f1a26225e76784353287373ec7172a4)

(Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitex)

1. 60 mg rostlinného materiálu (listy) se v 1,5 ml eppendorfkách za pomoci tekutého dusíku dokonale zhomogenizuje.
2. přidáme 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy K, vortexujeme a 30 minut inkubujeme při 65°C. Během inkubace 2 – 3krát promícháme. Připravíme si Spin Filter do 2,0 Receiver Tube.
3. Lyzační roztok převedeme na Spin Filter (kolonku), centrifugujeme 1 minutu při 12000 rpm. Vortexujeme a necháme 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
4. K filtrátu přidáme 200 µl Binding Buffer (vázacího pufru) a důkladně vortexujeme.
5. Nový Spin Filter vložíme do 2 ml Receiver Tube. Vzniklou suspenzi přeneseme na Spin Filter a inkubujeme 1 minutu při 12000 rpm. Poté vzniklý filtrát slijeme a kolonku vrátíme do původní Receiver Tube.
6. Přidáme 550 µl Wash Buffer I (promývacího pufru) a centrifugujeme 1 minutu při 12000 rpm. Slijeme filtrát a opět ponecháme kolonku v Receiver Tube.
7. Přidáme 550 µl Wash Buffer II a centrifugujeme 1 minutu při 12000 rpm. Vzniklý filtrát slijeme a tento krok zopakujeme. Nakonec slijeme filtrát a centrifugujeme 2 minuty při 12000 rpm k odstranění reziduálního ethanolu.
8. Spin Filter s navázanou DNA přendáme do nových 1,5 ml Receiver Tube, přidáme 100µl Elution Buffer D (elučního pufru D) předem předeřátého na 65° C. Inkubujeme 3 minuty a poté 1 minutu centrifugujeme při 10000 rpm.

