JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D

Diplomová práce

Využití molekulárních markerů pro studium genetické diverzity šlechtitelských materiálů řepky

Autor diplomové práce: Bc. Pavla Čížková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Jozová Ph.D.

České Budějovice, 2018

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Pavla ČÍŽKOVÁ**
Osobní číslo:	**Z16343**
Studijní program:	**N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor:	**Zemědělské biotechnologie**
Název tématu:	**Využití molekulárních markerů pro studium genetické diverzity šlechtitelských materiálů řepky**
Zadávající katedra:	**Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je optimalizace a analýza ISSR markerů a vyhodnocení genetické diverzity šlechtitelských materiálů řepky používaných v současných šlechtitelských programech řepky ozimé.
Úvod: stručný nástin molekulárních technik a jejich významu pro hodnocení a management genetických zdrojů rostlin.
Cíle práce: definice hypotéz a cílů práce.
Literární přehled: metody DNA fingeprintingu, zhodnocení významu molekulárních markerů pro účely popisu a identifikace odrůd a genetických zdrojů, základní aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin.
Materiál a metody: popis a charakteristika analyzovaných genetických zdrojů, izolace DNA a analýzy molekulárních markerů.
Výsledky: vyhodnocení profilů molekulárních markerů, výsledky analýz molekulárních markerů, vyhodnocení elektroforetických dat, vyhodnocení stability DNA profilů, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.
Diskuze: porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.
Závěr: přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.
Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).
Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací:	**10 - 15 stran**
Rozsah pracovní zprávy:	**40 - 50 stran**
Forma zpracování diplomové práce:	**tištěná**

Seznam odborné literatury:

Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley & Sons, Inc., New York
Avise J.C. (2004): Molecular Markers, Natural History, and Evolution. - Sinauer Associates, London
Weising K. et al. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. - CRC Press, Boca Raton, USA
Koh H.J. et al. (2015): Current Technologies in Plant Molecular Breeding. Springer, New York
Schmidt R., Bancroft I. (2011): Genetics and Genomics of the Brassicaceae, Springer, New York
Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts

Vedoucí diplomové práce:	**Ing. Eva Jozová, Ph.D.**
	Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Konzultant diplomové práce:	**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
	Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Datum zadání diplomové práce:	**23. února 2017**
Termín odevzdání diplomové práce:	**30. dubna 2018**

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení L.S.
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

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

V Českých Budějovicích dne 23. února 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Využití molekulárních markerů pro studium genetické diverzity šlechtitelských materiálů řepky“ vypracovala samostatně na základě svých výsledků a použila jen materiály, které uvádím v seznamu použité literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 2018

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Evě Jozové Ph.D. za trpělivost, odborné rady v laboratoři a konzultace pro zpracování. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry genetiky a speciální produkce rostlinné za rady a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Tato práce je zaměřená na použití metody ISSR pro studium genetické diverzity řepky olejné (*Brassica napus* L.). Celkem bylo hodnoceno 180 genotypů. Jako vstupní materiál byly použity zmražené listy řepky tří šlechtitelských stanic: 1/ Šlechtitelská stanice Selgen a.s., 2/ OSEVA PRO s.r.o. a 3/ Šlechtitelská stanice Slapy u Tábora. Izolace DNA byla provedena metodou CTAB podle Williamse modifikovanou pro řepku. Pro metodu ISSR byly vybrány 4 UBC primery, které vykazovaly vysokou variabilitu a stabilitu. Analýza probíhala pomocí gelové elektroforézy. V práci je rovněž zahrnuto porovnání gelové a čipové elektroforézy.

Výsledkem práce jsou matice podobnosti mezi jednotlivými odrůdami, které byly poskytnuty zpět šlechtitelům jako podklad pro další šlechtění.

Klíčová slova: *Brassica napus*, metoda ISSR, UBC primer

Summary

This thesis is based on the use of ISSR method for studying genetic diversity of oilseed rape. Altogether, 180 genotypes were evaluated. Frozen leaves of oilseed rape from three breeding station called: 1/ breeding station Selgen a.s., 2/ OSEVA PRO s.r.o. and 3/ breeding station Slapy u Tábora were used as imput material. DNA isolation was performed by Williams, who modified CTAB method for oilseed rape. We selected for ISSR 4 UBC which showed high variability and stability. The analysis was performed by gel electrophoresis. This thesis is also focused on comparison of gel electrophoresis and chip electrophoresis.

In this thesis We show a matrix of simmilarity between varieties. The results were also provided back to breeders as a basis for further breeding.

Key words: *Brassica napus,*ISSR method, UBC primers

Obsah

1. Úvod ... 8
2. Literární přehled ... 9
2.1. Taxonomické zařazení: ... 9
2.2. Produkce řepky ... 10
2.2.1. Význam pěstování řepky ... 10
2.3. Pěstitelská charakteristika řepky ozimé ... 11
2.4. Odlišnosti jarní řepky ... 12
2.5. Cytogenetika řepky ... 12
2.6. Šlechtění v ČR ... 14
2.6.1. Období klasických odrůd ... 14
2.6.2. Období „0“ odrůd ... 14
2.6.3. Období „00“ odrůd ... 15
2.7. Typy odrůd ... 16
2.7.1. Liniové odrůdy ... 16
2.7.2. Hybridní odrůdy ... 17
2.8. Genetická diverzita ... 18
2.8.1. Genetická diverzita řepky olejné ... 19
2.9. Využití molekulárních markerů ... 20
2.9.1. DNA markery ... 21
2.9.2. Markery založené na principu hybridizace ... 23
2.9.3. Markery založené na principu PCR ... 23
3. Cíle práce ... 27
4. Materiál a metodika ... 28
4.1. Použitý materiál ... 28
4.2. Izolace DNA ... 32
4.3. Měření koncentrace DNA ... 33
4.4. Přečištění DNA ... 34
4.5. PCR ... 34
4.6. Příprava agarozového gelu ... 36
4.7. Gelová elektroforéza ... 36
4.8. Čipová elektroforéza ... 37
5. Výsledky práce ... 38

5.1. Primery vhodné pro řepku 38
5.1.1. Testování UBC primerů 38
5.1.2. Gradientová PCR 39
5.2. Porovnání čipové a gelové elektroforézy 41
5.3. Výsledky pro jednotlivé primery 42
5.4. Ukázka binární matice 43
5.5. Výsledky ISSR analýz 44
5.5.1. Výsledky pro šlechtitelskou stanici Opava 45
5.5.2. Výsledky pro šlechtitelskou stanici Chlumec 46
5.5.3. Výsledky pro šlechtitelskou stanici Slapy 47
5.5.4. Celkový výsledek 48
6. Diskuze 50
7. Závěr 52
8. Seznam obrázků, grafů a tabulek 54
9. Použitá literatura 55

1. Úvod

Brukev řepka olejka (*Brassica napus* L. subsp. *napus*) je celosvětově druhou nejpěstovanější olejninou za sójou a v České republice nejpěstovanější olejninou s osevní plochou cca 400 tisíc hektarů. U nás je zároveň druhou nejpěstovanější plodinou po pšenici a to díky dosažení vysokých hektarových výnosů a širokému uplatnění řepkového semene. Využívá se jak v krmivářství, v potravinářském průmyslu, v chemickém průmyslu, tak i jako obnovitelný zdroj energie.

Kvůli intenzivnímu šlechtění se snižuje genetický základ řepky, který je velice důležitý pro kontinuitu druhu, vyrovnáním se s nepříznivými podmínkami a celkové zachování druhu. Zároveň klesá míra genetické diverzity u genetických zdrojů, proto dochází ke zvýšení obtížnosti identifikace odrůd a problematické je i získávání genetických zdrojů pro nové šlechtitelské cíle.

Dříve byly pro odhad genetické variability používané morfologické znaky, které v důsledku rostoucího počtu odrůd nestačily pro jejich identifikaci. Dnes jsou nejčastěji využívané molekulární markery, které přesně detekují DNA polymorfizmy. Zároveň se neustále vyvíjejí nové techniky, které vyhodnotí genetickou variabilitu rychleji a levněji.

K největší revoluci při zkoumání rostlinného genomu došlo v posledních desetiletích u DNA markerů, kam řadíme RFLP, DNA čipy, a častěji používané DNA markery založené na PCR, kam řadíme například AFLP, SNP, SSR nebo například ISSR.

Díky vývoji PCR metody vzniklo velké množství markerovacích technologií, které byly vytvořeny i molekulární mapy pro hlavní druhy rodu *Brassica*. Pro studium genetické variability a variability organismu je výhodné použít ISSR metodu, která má sice nízkou reprodukovatelnost, je však technologicky málo náročná a není potřeba předchozí znalost genomu.

2. Literární přehled

2.1. Taxonomické zařazení:

Brukev řepka olejka je řazena do jedné z nejvýznamnějších čeledí řádu *Brassicales* a to *Brassicaceae*, obsahující více než 330 rodů a přibližně 3700 druhů. Ty zahrnují plodiny, jako jsou *Brassica oleracea* (brukev zelná), *Brassica napus* (brukev řepka), *Armoracia rusticana* (křen selský), dále okrasné plodiny jako *Lunaria* (měsíčnice), *Iberis* (štěničník), *Aubrieta* (tařička), *Arabis* (huseník) a v neposlední řadě rostliny používané jako modelový organismus jako například *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) nebo *Arabidopsis lyrata* (Schmidt a Bancroft, 2011). Nejvýznamnější rod čeledi *Brassicaceae* (brukvovité) je rod *Brassica* (brukev), do kterého řadíme druh *Brassica napus* - brukev řepka (Vašák, 2000).

Brukev řepka se dále dělí na dva poddruhy: *Brassica napus* subsp. *napus* (brukev řepka olejka) a *Brassica napus* subsp. *napobrassica* (*Brassica napus* subsp. *rappera Metzer*, brukev řepka tuřín - kolník).
(Baranyk a kol., 2007)

Zařazení druhu:

ŘÍŠE	- *Plantea* (Rostliny)
ODDĚLENÍ	- *Magnoliphyta* (Krytosemenné)
TŘÍDA	- *Rosopsida* (Vyšší dvouděložné)
ŘÁD	- *Brassicales* (Brukvotvaré)
ČELEĎ	- *Brassicaceae* (Brukvovité)
ROD	- *Brassica* (Brukev)
DRUH	- *Brassica napus* (Brukev řepka)

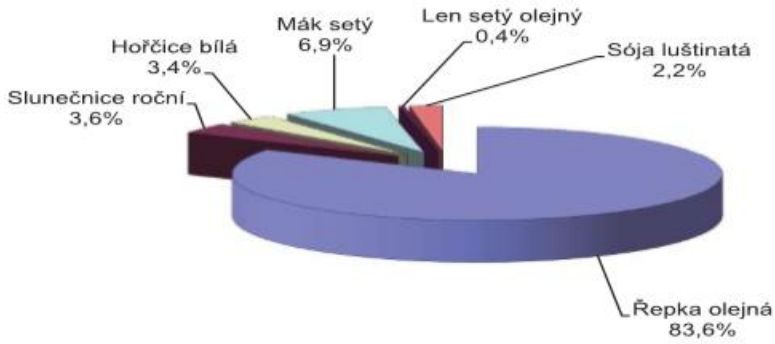
(Hejný a Slavík, 2003)

2.2. Produkce řepky

Řepka olejka je na druhém místě ve světové produkci olejnin s přibližnou produkcí 55 milionů tun semen (Baranyk a kol., 2010). Celosvětově nejpěstovanější olejninou je sója s produkcí 326 milionů tun v roce 2016 (Štranc a kol., 2016).

Největším producentem a posléze i zpracovatelem řepky je Evropská unie s produkcí 19 milionů tun. Druhým největším producentem řepky je s produkcí 12 milionů tun Čína. Ta však z hlediska obchodu nehraje významnou roli. Třetím nejvyšším producentem řepky je Kanada, která je naopak se svou produkcí 10 - 11 milionů tun největším světovým exportérem této plodiny, proto významně ovlivňuje cenu. Další producenti jako jsou Austrálie nebo USA jsou spíše příležitostnými exportéry (Baranyk a kol., 2010).

V České republice jsou olejniny cenné plodiny, protože řada z nich patří ke zlepšujícím. Používají se jako přerušovače osevních sledů, často přetížených obilninami. Zcela nejvýznamnější olejninou v České republice je řepka olejná v ozimé formě. Procentuální zastoupení olejnin u nás je znázorněné na grafu č. 1. Z něj je patrné, že řepka olejná je nejpěstovanější olejninou (Baranyk, 2016).



Graf č. 1: Průměrné sklizňové plochy olejnin v ČR v letech 2014 - 2016 (Baranyk, 2016)

2.2.1. Význam pěstování řepky

Řepka olejná se nejvýznamněji uplatňuje ve čtyřech odvětvích:

1. Krmivářství (extrahované šroty, pokrutiny)
2. Potravinářství (surovina v lidské výživě)
3. Oleochemie (řepkový olej jako surovina v chemickém průmyslu)
4. Zdroj obnovitelné energie (Baranyk a kol., 2007).

2.3. Pěstitelská charakteristika řepky ozimé

Řepka olejná se v mírném pásmu pěstuje ve dvou formách: ozimé a jarní. Jarní řepka, nebo spíše její příbuzná jarní řepice, se pěstuje v Číně a v jihovýchodní Asii, nalezneme ji však také ve Finsku, Rusku (Baranyk a kol., 2007) nebo také v drsnějších oblastech Kanady. V roce 1987 rapidně vzrostla produkce a využití jarní řepky (nazývaná canola) v Kanadě (Shahidi, 1990). Ozimá forma převažuje v západní a střední Evropě (Baranyk a kol., 2007).

V našich podmínkách je vegetační doba ozimé řepky 300 - 340 dnů (nejčastěji 320 - 330). Výjimkou jsou pouze místa s nadmořskou výškou nad 600 m, kde může být vegetační doba i celý rok (Vašák, 2000). Řepka se rozšířila do všech výrobních oblastí České republiky, ale nejvhodnější oblast pro pěstování řepky je oblast bramborářská a řepařská. V kukuřičných oblastech situovaných v nižších nadmořských výškách na bohatších půdách je řepka vystavována chorobám a škůdcům. Teplotně nejvhodnější místa pro pěstování řepky se udávají oblasti s průměrnými ročními teplotami 6,5 - 8,5 ^{o}C a úhrnem srážek 550 - 750mm. (Bečka a kol., 2007). Nejlépe se řepce daří v půdách dostatečně zásobených humusem, hořčíkem a vápníkem. Optimální půdní pH pro růst řepky je 6 - 6,5 (Baranyk, 1994).

Jako naprosto nevhodné prostředí pro pěstování řepky se udávají půdy, které jsou na jaře nebo podzim dlouhodobě zamokřené, na utužených pozemcích nebo na lokalitách s holomrazy pod - 15 ^{o}C (Bečka a kol., 2007).

Pro rovnoměrné vzejití je nutné při setbě na konci srpna větší množství srážek. Po vytvoření čtyř praporcových listů je prospěšné sušší a chladnější počasí, to napomáhá k vytvoření bohatého kořenového systému.

Během zimních dnů jsou vhodné mírnější teploty, rostliny však snášejí i krátkodobé snížení teploty na - 20 ^{o}C. Při nízkých teplotách je důležitá sněhová přikrývka, ta umožňuje pěstování řepky v drsnějších a vyšších polohách.

Obzvláště škodlivé je střídání teplot v předjaří. V těchto měsících dochází k pohybům půdy, kdy jsou slabě zakořeněné rostlinky vytahované z půdy, poškozeny a následně napadeny houbovými chorobami.

Důležitý průběh teplot je v období butonizace. Pokud je v tomto období nadměrné chladno, dochází k opadání poupat a květů, tím se snižuje počet šešulí a následně výnosu (Baranyk, 1994).

2.4. Odlišnosti jarní řepky

Jarní řepka zaujímá v České republice daleko méně plochy než řepka ozimá a to hlavně kvůli kolísavým výnosům a pozdní sklizni. Jarní řepka dosahuje zhruba polovinu výnosu v porovnání s řepkou ozimou. Je však používaná jako vhodná alternativa za řepku ozimou (Baranyk a kol., 2007). Například v roce 2011 byla v České republice výnosová úroveň jarní řepky od 0,7 – 3,1 t/ha a celkově bylo sklizeno okolo 2500 tun (Švachula a kol., 2011).

Vhodný měsíc pro setí jarní řepky se udává konec února, popřípadě začátek března. Je nutné její včasné zasetí, protože je daleko citlivější než řepka ozimá a na zpoždění v setí reaguje sníženým výnosem. Osivo je účelné mořit a vzcházející rostliny je nutné chránit proti dřepčíkům insekticidy (Baranyk a kol., 2007).

2.5. Cytogenetika řepky

Brassica napus je allotetraploid odvozený z hybridizace *B. rapa* a *B. oleracea*, kdy úzký vztah *B. napus* a *B. rapa* vede k obtížnému rozeznání. Díky rozdílnému počtu chromozomů lze tyto dva druhy spolehlivě rozlišit (Luijten a Jong, 2010).

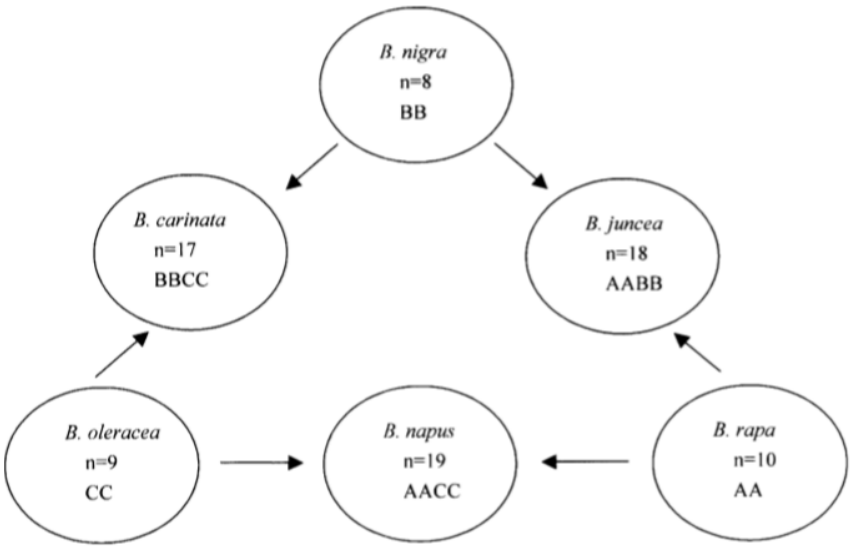
Na obrázku č. 1 je zobrazen trojúhelník křížení mezi druhy rodu *Brassica*, který je velmi užitečný pro řešení otázek genomové evoluce u polyploidů. Skládá se ze tří diploidních druhů *Brassica nigra* (2n= 16), *Brassica rapa* (2n= 20) a *Brassica oleracea* (2n= 18). Tři druhy jsou alotetraploidní, a to *Brassica carinata* (2n= 34), *Brassica jucea* (2n= 36) a *Brassica napus* (2n= 18). Tyto druhy vznikly křížením mezi třemi diploidními druhy a následnému zdvojování chromozomů (Liu a Wang, 2006). Jako první vytvořil toto schéma evoluce brukvovitých rostlin (řepky) v roce 1935 korejský botanik U pracující v Japonsku, proto je tento trojúhelník známý jako „triangle of U“ (Luiten a Jong, 2010).

Mapovací studie ukázaly, že jaderný genom *B. napus* zůstal od svého vzniku v podstatě nezměněn (Liu a Wang, 2006).

Křížení parentálních druhů je velice obtížné, kdy vlivem endospermu dochází k aborci zárodku. Pomocí embryokultur lze získat syntetické formy této plodiny, a to

křížením diploidních rodičů, následným použitím kolchicinu na potomstvo a křížením autotetraploidních forem rodičů.

B. napus je obecně samosprašná (autofertilní), zatímco její rodičovské druhy mají účinný systém sporofytické inkompatibility (Vašák, 2000).



Obr. č. 1: Křížení rodu *Brassica* (Liu a Wang, 2006)

2.6. Šlechtění v ČR

Pěstovaní řepky a její odrůdovou skladbu v České republice lze rozdělit do několika základních etap: období klasických odrůd, období bezerukových odrůd („0“ odrůda), období bezerukových odrůd s nízkým obsahem glukosinolátů („00“ odrůd). Vývoj odrůdové skladby je určující pro rozšíření řepky v zemědělské praxi. Šlechtitelský pokrok u řepky olejné v České republice je znázorněn v tabulce č. 1 (Baranyk a kol., 2007).

2.6.1. Období klasických odrůd

Do 50. let 20. století byla řepka málo prošlechtěná a její olej se používal především ke svícení, mazání strojů, popřípadě jiným průmyslovým účelům. Jako krmivo pro hospodářská zvířata se řepka používala pouze zřídka kvůli vysokému obsahu glukosinolátů a vysokému obsahu kyseliny erukové.

V této době byly pěstovány nejčastěji odrůdy německého, kanadského či holandského původu, popřípadě české krajové odrůdy.

Jako první česká odrůda ozimé formy byla zapsána v roce 1941 do Listiny povolených odrůd Třebíčská odrůda, vyšlechtěná na šlechtitelské stanici Stránecká Zhoř. Jako druhá odrůda byla zapsaná v roce 1946 odrůda Slapská, vyšlechtěná ve šlechtitelské stanici Slapy. Obě odrůdy byly vyšlechtěny z krajových odrůd příslušných oblastí.

Konec pěstování řepky ozimé s vysokým obsahem kyseliny erukové je datováno na rok 1982. Pěstování jarní formy řepky nepřesáhlo několik tisíc hektarů (Baranyk a kol., 2007).

2.6.2. Období „0“ odrůd

Hlavním omezujícím faktorem pro použití řepkového oleje v lidské výživě byl vysoký obsah kyseliny erukové (Plieske a Struss, 2001). S odrůdami poskytujícími nový typ oleje neobsahující kyselinu erukovou se řepkový olej stal významným stolním olejem a surovina pro další výrobky, jako jsou majonézy nebo

ztužené tuky. Bezerukové odrůdy se však stále neuplatnila ve výživě hospodářských zvířat vzhledem k vysokému obsahu GSL.

Sortiment „0“ odrůd byl na našem území původně tvořen zahraničními odrůdami, kdy první zapsaná odrůda byla Primor z Francie. První českou odrůdou byla Silesia z Výzkumného ústavu olejnin v Opavě registrována v roce 1983. Jarní formy „0“ odrůd nebyly na našem území registrovány (Baranyk a kol., 2007).

2.6.3. Období „00“ odrůd

Další faktor, který bránil plnému zhodnocení řepkového semene, byl vysoký obsah glukosinolátů. Glukosinoláty (hořčiny) působí negativně na zdraví zvířat, kdy dochází nejčastěji k poškození jater. Tento problém byl vyřešen vyšlechtěním bezerukových odrůd s nízkým obsahem glukosinolátů.

První „00“ odrůda zapsaná do Státní odrůdové knihy (SOK) v České republice byla odrůda řepky jarní Loras vyšlechtěná v Německu. Jako první „00“ odrůda ozimé řepky na našem území byla do SOK zapsána francouzská Darmor v roce 1989. První česká „00“ odrůda byla odrůda vyšlechtěná v Opavě – Sonáta v roce 1990 (Baranyk a kol., 2007).

Tabulka č. 1: Stručný přehled šlechtění řepky (Baranyk, 2007; Hájková, 2006)

Období (přibližně)	Charakteristika odrůd	Využití
Do roku 1975	„EG“ odrůdy s nevyhovující kvalitou – vysoký obsah kyseliny erukové (KE) v oleji a glukosinolátů (GLS) ve šrotu	Malé množství využití; olej hlavně pro technické účely
Roky 1975 – 1985	„0“ odrůdy se sníženým obsahem KE (do 5%), ale vysokým obsahem GSL	Rozšíření pro potravinářské využití, prakticky bez krmivářského uplatnění, zvýšení osevních ploch
Rok 1985 - současnost	„00“ odrůdy s minimálním obsahem KE a nízkým obsahem GSL (zprvu do 30 µmol/g semene, od r. 2005 do 18 µmol/g semene v osivu)	Bezproblémové potravinářské využití, přidání šrotů a výlisků do krmných směsí, zvýšení osevních ploch
Od roku 1995	Rozšíření hybridních odrůd (nejdříve na bázi systému MSL Lembke, později OguINRA)	Stejné použití jako „00“ odrůdy, avšak uplatnění heterozního efektu v podobě vyšších výnosů,

		obecně lepší odolnost rostlin proti stresům
Od roku 2000	Výkonné liniové odrůdy s velmi nízkým obsahem GLS, nové trendy – změněná skladba mastných kyselin v oleji, žlutotemenné odrůdy, trpasličí odrůdy, využití GM biotechnologií atd.	Nárůst osevních ploch, šlechtění odrůd se „speciálním složením“ olejů, potravinářské účely, MEŘO pro výrobu bionafty, tolerance k herbicidům, mrazuvzdornost, odolnost vůči chorobám a škůdcům
Současnost	HEAR HiOL HOLL HOLP HELP	Řepky se specifickým složením mastných kyselin využitelné jak v potravinářském průmyslu, tak zejména v chemickém průmyslu
Současnost ve světě	Transgenní řepka	Nepovolená pěstovat v ČR Jednou z mnoha oblastí zájmu je tvorba herbicid tolerantních odrůd

2.7. Typy odrůd

Řepka olejná se může vyskytovat ve dvou typech odrůd: liniové a hybridní. Zatímco u hybridních odrůd je nejdůležitější získat co nejvyšší heterózní efekt v F1 generaci, u liniových odrůd se pro tvorbu odrůd využívá samoopylování.

2.7.1. Liniové odrůdy

U liniových odrůd každá linie představuje potomstvo od jedné rostliny po homozygotizaci (opakovaném samoopylování). Proto se odrůdy liniového typu šlechtí převážně u samosprašných rostlin.

U tohoto typu odrůd dochází po opakovaném samoopylování ke vzniku homozygotní čisté linie, která bývá homogenní a nevyznačuje se žádnou genetickou variabilitou. Genetická variabilita uvnitř linií existuje pouze u vzácně se objevujících mutací nebo při cizosprášení, po kterém vznikají rekombinace, které zvyšují heterozygotnost (Ehrenbergerová, 2014).

V České republice jsou registrované liniové odrůdy řepky olejné jak ozimé tak jarní formy. Liniové odrůdy jsou často různého typu - zúžené populace, pylově

fertilní linie nebo například dihaploidi. Jejich pěstování se řídí obvyklou agrotechnikou (Zehnálek a kol., 2008).

Pro vytvoření nových liniových odrůd je potřeba nejdříve křížit dvě rodičovské odrůdy (původu linie). U F1 generace je získaná nová frekvence genů, která je zachována do dalších generací, dokud není provedena selekce. Nejvíce genových rekombinací je v F2 generaci. Pokud si rodiče použití ke křížení byli podobní, dochází ke vzniku nové liniové odrůdy dříve než u rodičů lišících se od sebe. Pro přihlášení linie do zkoušek pro registraci odrůd se používají generace F7-F10 (Ehrenbergerová, 2014).

2.7.2. Hybridní odrůdy

U hybridních odrůd se vybírají rodičovské komponenty tak, aby po křížení poskytly požadovaný výnos a v F1 generaci schopnost dát heterózní efekt. Nevýhodou u hybridního osiva je snižující se výnos po přemnožování do F2 a dalších generací, proto je nutné každý rok vyrábět nové osivo F1 hybridů (Ehrenbergerová, 2014).

První hybridní odrůdy řepky ozimé byly do SOK zapsány koncem 90. let, kdy se jednalo o „00“ materiály (Vašák, 2000).

V České republice se hybridní řepka pěstuje na provozních plochách od roku 1998. V dnešní době je o pěstování hybridní řepky daleko větší zájem, kdy některé podniky pěstují již pouze hybridní řepku. V dnešní době se u nás z přibližně 90% pěstuje hybridní řepka a z 10% liniové odrůdy řepky. Toto zastoupení kolísá v jednotlivých regionech, nižší podíl hybridů se nachází například v severozápadních, západních a jižních Čechách (Baranyk a kol., 2017). Při pěstování hybridní řepky je nutné zohlednit heterózní efekt, který není využíván u běžných liniových odrůd (Baranyk, 2013).

Výhody hybridních odrůd:

1. Vysoký výnos semene
2. Vysoká tolerance k horku a suchu, zároveň vysoká zimovzdornost, nízká citlivost k nepříznivému počasí

3. Rychlejší a mohutnější nárůst během podzimní vegetace (Baranyk a kol., 2017).

Nevýhody hybridních odrůd:

1. Vyšší nároky na pěstitelské podmínky
2. Dražší osivo
3. Nutnost 100 % obměny osiva

2.8. Genetická diverzita

Biodiverzitu můžeme rozdělit na biodiverzitu na úrovni ekosystému (společenství druhů a jejich prostředí), na úrovni druhu (druhová bohatost) a na biodiverzitu na genové úrovni (variance genů a genotypů), která se jinak také nazývá genetická diverzita (Rao a Hodgkin, 2002).

Na zemi se vyskytuje okolo 391 tisíc cévnatých rostlin (Kew, 2016). Avšak z 95 % je potravinová bezpečnost lidstva závislá na pouhých třiceti hlavních plodinách. Z toho 60% lidské potravy tvoří čtyři základní potraviny: rýže, pšenice, kukuřice a brambory. Díky závislosti na poměrně malém počtu plodin je zásadní zachovat vysokou genetickou rozmanitost. Rostliny se musejí vypořádat s rostoucím stresem, který může být zapříčiněný nepříznivými podmínkami, jako jsou sucho, záplavy, zasolení nebo špatná půda a extrémní teploty (FAO, 2018). Genetická různorodost plodin je nejvíce dána původem jednotlivých druhů (Chloupek, 2000).

Genetická diverzita má zásadní význam pro kontinuitu druhu, protože poskytuje nezbytnou adaptaci na převládající biotické a abiotické podmínky prostředí. Zároveň odhaluje rozsah genetických variací existujících v rostlinných populacích (Caliskan, 2012).

Díky dostupnosti molekulárních markerů využívajících PCR metody je umožněna analýza a vyhodnocení genetické diverzity a zároveň je možné detekovat geny ovlivňující její ekonomicky důležité vlastnosti (Caliskan, 2012).

Genetická diverzita vznikla a stále vzniká rekombinacemi a mutacemi. Lze ji posuzovat na úrovni sekvence DNA, genomů, jedinců, populací a na úrovni tzv. gene pool (genetických rezervoárů) (Graman a Čurn, 1998).

2.8.1. Genetická diverzita řepky olejné

Řepka olejná je poměrně mladý druh, který vznikl v omezené zeměpisné oblasti spontánní hybridizací (Hasan a kol., 2006). Dnes je jedním z nejdůležitějších zdrojů oleje. Nicméně omezený zeměpisný rozsah a intenzivní pěstování řepky vedly k zúžení genetického základu. Genetický fond elitního reprodukčního materiálu byl dále zúžen díky šlechtění zaměřené na speciální olej se specifickými vlastnostmi (Hasan a kol., 2006). Pro rozšíření genetického základu je důležité, stejně jako u jiných plodin zhodnocení původních materiálů. V současné době je k dispozici řada metod pro analýzu genetické diverzity. Dříve se metody opíraly hlavně o rodokmenové, morfologické, o agronomické výkonnosti a biochemické údaje. Tyto markery byly úspěšné, jejich nevýhodou však bylo početní omezení a časová náročnost. Proto se přešlo k používání molekulárních markerů, které jsou považovány za nejlepší nástroje pro stanovení genetických vztahů jakýchkoliv druhů (Abbas a kol., 2009).

Pro zjištění genetického založení byly vyvinuty různé systémy molekulárních markerů. Programy pro pěstování řepky vyžadují efektivní, reprodukovatelnou markerovou platformu, která je vhodná pro celkovou genomovou analýzu (Raman a kol., 2012).

2.9. Využití molekulárních markerů

Pro studium genetické rozmanitosti plodin se v posledních letech stále častěji využívají molekulární markery. Neustále se vyvíjejí techniky, které přesněji, levněji a rychleji vyhodnocují genetickou variabilitu. Existuje několik typů markerů: morfologické (tvar rostliny nebo barva) a molekulární markery zahrnující proteinové (například izoenzym) a DNA markery, založené na odlišnostech v sekvenci (Kumar a kol., 2009). Srovnání odlišných typů genetických markerů je v tabulce č. 2.

Morfologické markery byly používané v minulosti například Johannem Georgem Mendelem nebo Thomasem H. Morganem. Byly používané až do širšího nástupu technik proteinových/biochemických a molekulárních/DNA markerů.

Proteinové markery jsou produktem genové exprese. Odlišné alely kódují odlišné aminokyselinové sekvence, které udávají odlišnou velikost nebo biochemickou charakteristiku proteinů, která může být pozorovatelná pomocí elektroforézy. Příkladem proteinového markeru je izoenzym (Koh a kol., 2015).

Tabulka č. 2: Srovnání odlišných typů genetických markerů (Koh a kol., 2015)

Typ	Výhody	Nevýhody	Příklady
Morfologické markery	Jednoduché testování	Vysoká závislost na environmentální faktory	Barva, tvar, atd.
	Levné	Obtížná analýza kvantitativních znaků	
		Obtížné určení heterozygotů	
		Limitovaná dostupnost	
Proteinové markery	Nízká cena	Testované vzorky musí být v dobrém stavu	Izoenzym
	Kodominancí	Limitovaná dostupnost	
	Menší závislost na environmentálních faktorech	Nestabilní materiál (proteiny)	
DNA markery založené na hybridizaci	Nepotřebujeme informaci o sekvenci	Nákladné a časově náročné	RFLP
	Kodominancí	Použití izotopů	
	Nezávislé na faktory prostředí	Vyžaduje velké množství DNA	
		Obtížné automatizovat	
DNA markery založené na PCR	Vyžaduje nízké množství DNA	Vyžaduje drahé vybavení	SSR
	Rychlé a snadné testování	Vyžaduje informace o sekvenci	AFLP
	Vysoká přesnost		RAPD
	Nezávislé na faktory prostředí		SNP

2.9.1. DNA markery

U DNA markerů došlo v posledních desetiletích k revoluci ve výzkumu rostlinného genomu (Snowdon a Friedt, 2003). DNA markery se používají pro odhalení polymorfismu a v dnešní době je jejich používání nezbytné pro pěstování hlavních plodin.

DNA molekulární markery rozdělujeme na dva typy. Prvním typem jsou markery, které jsou založené na principu hybridizace, kam řadíme RFLP (Restriction Fragment Leinght Polymorfism) a DNA čipy (Koh a kol., 2015). DNA je vizualizovaná hybridizací DNA štěpené restrikčními endonukleázami na značenou próbu, což je DNA o známé sekvenci. (Kumar a kol., 2009)

Druhým typem jsou markery založené na PCR (Polymerase Chain Reaction), kam řadíme techniky RAPD (Radom Amplification of Polymorfic DNA), AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorfism), SNP (Single Nucleotid Polymorfism) a SSR (Simple Sequence Repeat). Mikrosatelitový DNA marker je nejčastěji používaný díky jednoduchému použití PCR a následné fragmentační analýze (popřípadě elektroforéze), která stanoví velikost alel (Koh a kol., 2015). Markery založené na PCR zahrnují *in vitro* amplifikaci specifických DNA sekvencí nebo lokusů pomocí specificky nebo libovolně vybraných primerů (oligonukleotidových sekvencí) a termostabilní DNA dependentní DNA polymerázy. Amplifikované fragmenty jsou separovány pomocí elektroforézy (gelová, čipová, kapilární, …) a jsou detekovány různými metodami (Kumar a kol., 2009). Porovnání DNA markerů je v tabulce č. 3.

Díky tomu, že se v průběhu posledních let rozvinuly metody PCR, vzniklo velké množství nových markerových technologií DNA, které umožnily vytváření molekulárních map pro všechny hlavní druhy *Brassica.* Od roku 2000 se velmi často využívá celogenomové sekvenování plodin (Snowdon a Friedt, 2003).

Vlastnosti DNA markerů:

1. Polymorfní povaha (polymorfismus je měřítkem genetické diverzity)
2. Kodominantně dědičný: stanovení homozygotních a heterozygotních stavů diploidních organismů

3. Častý výskyt v genomu (marker by měl být často a rovnoměrně distribuován v genomu)
4. Snadná dostupnost a rychlá analýza
5. Vysoká reprodukovatelnost
6. Snadná výměna dat mezi laboratořemi (Kumar a kol., 2009).

Tabulka č. 3: Porovnání DNA markerů (Koh a kol., 2015)

Marker	Reprodukovatelnost	Technická obtížnost	Dědičnost	Informace o sekvenci
RFLP	Vysoká	Vysoká	Kodominantní	Nepožadovaná
RAPD	Nízká	Nízká	Dominantní	Nepožadovaná
AFLP	Vysoká	Střední	Kodominantní	Nepožadovaná
SNP	Vysoká	Vysoká	Kodominantní	Požadovaná
SSR	Vysoká	Střední	Kodominantní	Požadovaná
ISSR	Nízká	Nízká	Dominantní	Nepožadovaná

2.9.2. Markery založené na principu hybridizace

2.9.2.1. RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Random Amplification of Polymorfic DNA) je technika, při které mohou být organismy diferenciovány analýzou fragmentů odvozených od štěpení jejich DNA (Kumar a kol., 2009). Pro štěpení specifické DNA se používají restrikční endonukleázy. Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které rozpoznají specifickou sekvenci DNA a rozštěpí ji. Pokud se v místě štěpení objeví mutace, restrikční enzym toto místo nerozštěpí (Koh a kol., 2015).

Fragmenty vzniklé rozštěpením jsou vizualizované na agarózovém gelu a poté přeneseny na membránu Southern blottu. Fragmenty, které jsou předmětem zájmu, se identifikují hybridizací s radioaktivně značenou sondou.

RFLP může být použito v rozmanitých fylogenetických studiích, ve studiích mapování genů, k vyšetřování vztahů blízce příbuzných taxonů nebo jako nástroj pro snímání otisků prstů pro studium diverzity (Kumar a kol., 2009).

Metodu RFLP jako první popsal Bolstein et al. (1980) při popisování lidského genomu. Počet dostupných míst RFLP v rostlinách se pohybuje mezi desítkami až několika tisíci. RFLP jsou markery jednoho lokusu a jejich způsob dědičnosti je kodominantní (Ben-Ari a Lavi, 2012).

2.9.3. Markery založené na principu PCR

2.9.3.1. RAPD

Náhodná amplifikace polymorfní DNA (Radom amplification of polymorfic DNA) je metoda založená na enzymatické amplifikaci cílových nebo náhodných DNA segmentů s libovolnými primery (Kumar a kol., 2009).

Náhodné primery se mohou vázat s jakýmikoliv komplementárními místy v genomu. Když jsou dva primery dostatečně blízko, může dojít k amplifikaci pomocí PCR a následné analýze pomocí elektroforézy.

Markery RAPD se poměrně rychle a snadno rozvíjejí, jejich reprodukovatelnost se může měnit s podmínkami, proto je jejich přesná genotypová analýza obtížná (Koh a kol., 2015). RAPD markery jsou použity v analýze

variability, nebo pro vyplnění mezer vytvořených jinými markery (Kumar a kol., 2009).

2.9.3.2. AFLP

Metoda polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů (Amplified Fradmenr Length Polymorfism) je založena na selektivní amplifikaci restrikčních fragmentů z komplexní směsi DNA fragmentů získaných štěpením genomové DNA restrikčními endonukleázami (Matthes a kol., 1998). Poprvé popsal tuto metodu Vos v roce 1995 (Vos a kol., 1995).

Technika AFLP kombinuje principy RFLP a PCR. Polymorfizmy jsou detekovány z rozdílných délek amplifikovaných fragmentů vizualizovaných dříve gelovou eketroforézou (Matthes a kol., 1998), dnes se častěji používá fragmentační analýza s fluorescenčně značeným primerem (Koh a kol., 2015).

Technika AFLP zahrnuje 3 základní kroky: 1) restrikce DNA nejčastěji dvěma různými restrikčními enzymy a následná ligace lepivých konců štěpených fragmentů pomocí adaptorů (aby nedocházelo k následnému spojení restrikčních fragmentů), 2) selektivní amplifikace pomocí AFLP primerů, 3) vizualizace amplifikovaných fragmentů pomocí gelové elektroforézy (Vos et al., 1995) nebo pomocí fragmentační analýzy, kdy je jeden primer označen radioaktivním izotopem nebo fluorescenční barvou (Koh a kol., 2015).

Hlavní výhodou této metody je, že není nutná předchozí znalost nukleotidové sekvence (Vos a kol., 1995). AFLP se používá při studiích blízce příbuzných druhů, při studiu biodiverzity, přípravě markerů nebo například identifikaci klonů (Kumar a kol., 2009)

2.9.3.3. SNP

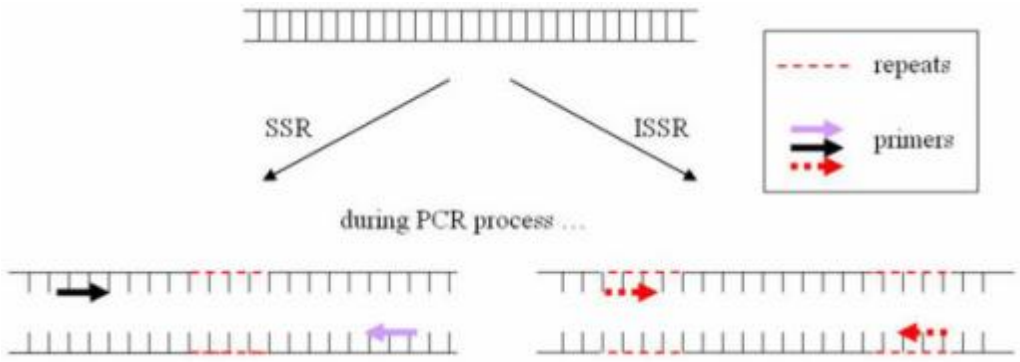
Jednonukleotidový polymorfismus (Single Nukleotide Polymorfism) je založený na skutečnosti, že většina polymorfismů vzniká změnou v jedné nukleotidové pozici. Pro analýzu je nutná znalost genomu pro navržení specifických primerů pro PCR nebo pro navržení oligonukletidových sond (Vignal a kol., 2002).

2.9.3.4. SSR

SSR (Simple Sequence Repeats) nebo také mikrosatelitové oblasti jsou části DNA, které obsahují tandemové opakovaní di-, tri-, tetra- nebo pentanukleotidových jednotek, které se nacházejí po celém genomu většiny eukaryotických druhů. Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní a kodominantní markery. Délka motivu je 2 - 4 párů bazí a opakování jsou uspořádaná po 5 -50 kopiích (Powell a kol., 1996). Na obrázku č. 2 je porovnání metody SSR a ISSR. Metoda SSR používá dva primery, které amplifikují konkrétní úsek. Naopak metoda ISSR používá jeden primer založený na repetici mezi dvěma úseky (Yip a kol., 2007).

Mikrosatelitové sekvence jsou všudypřítomné v eukariotních organismech (Bornet a Branchard, 2004) a jsou zvláště vhodné pro rozlišení úzce souvisejících genotypů a pro identifikaci blízce příbuzných odrůd. Pokud jsou známy nukleotidové sekvence v okrajových oblastech mikrosatelitu, jsou navrženy primery o 20 - 25 páru bazí pro amplifikaci mikrosatelitu pomocí PCR. Alternativně mohou být použity primery navržené pro blízce příbuzné druhy. Identifikace polymorfismu je pomocí gelové elektroforézy nebo dnes častěji používané fragmentační analýzy (Kumar a kol., 2009).

Výhody využívání SSR markerů jsou velké množství mirosatelitových oblastí, vysoký stupeň polymorfismu, schopnost jeho označení v genomu a jeho snadná detekce (Kresovich a kol., 1995).



Obr. č. 2: Porovnání metody SSR a ISSR

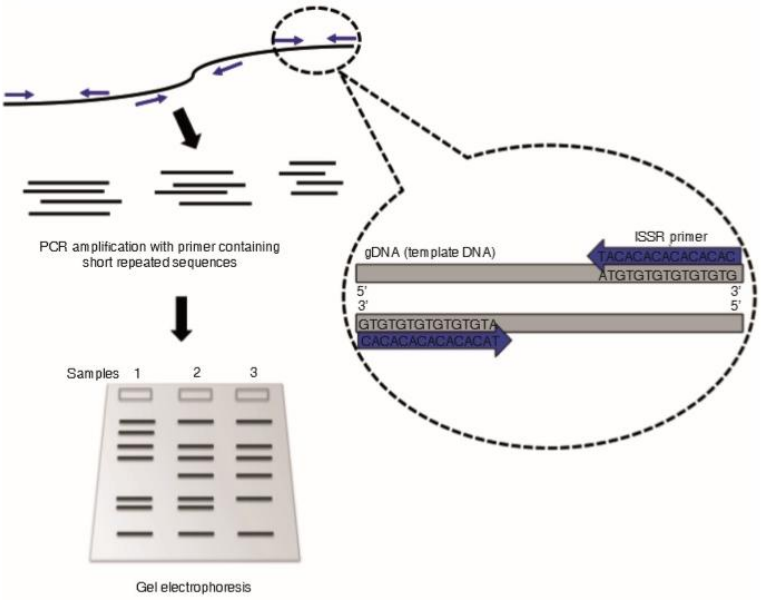
2.9.3.5. ISSR

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) jsou místa v genomu obklopená mikrosatelitovými sekvencemi (NG a Tan, 2015). Mikrosatelity jsou fragmenty přibližně 100 - 3000 párů bazí umístěných mezi sousedními, opačně orientovanými oblastmi (Kumar a kol., 2009). PCR amplifikace těchto částí s použitím jednoho primeru přináší více naamplifikovaných produktů, používaných pro studium genetické variability a variability organismu (NG a Tan, 2015).

Prvním krokem ISSR je izolovat vysoce kvalitní genomickou DNA a standardizovat množství templátové DNA pro PCR reakci. Následná PCR používá pouze jeden primer o délce 16 - 25 bazí, tento primer má funkci foreward a reverse primeru (Reddy a kol., 2002).

Pro vizualizaci PCR produktů se používá polyakrylamidový nebo agarozový gel, popřípadě čipová elektroforéza. Posledním krokem je skórování ISSR fragmentů a následná analýza dat. Na obrázku č. 2 je znázorněn celý postup ISSR.

Výhody ISSR markerů jsou nízká cena, jednoduché použití a méně náročné porovnání s dalšími dominantními markery (NG a Tan, 2015).



Obr. č. 3 : PCR amplifikace pomocí ISSR primerů (NG a Tan, 2015)

3. Cíle práce

Tato práce je zaměřena na tyto hlavní cíle

- Optimalizace primerů
    - Testování nejvhodnějších primerů pro posouzení variability u řepky
    - Nalezení nejvhodnější teploty nasedání primerů (annealingu) pomocí gradientové PCR

- Porovnání vhodnosti použití gelové elektroforézy a čipové elektroforézy

- Hodnocení genetické diverzity u odrůd a novošlechtění řepky
    - Použití metody ISSR
    - Vytvoření matice přítomnosti a nepřítomnosti fragmentů
    - Pomocí programu MVSP vytvořit matici podobnosti mezi jednotlivými odrůdami

4. Materiál a metodika

4.1. Použitý materiál

Materiál pro výpočet mapy genetické diverzity pro rok 2017 byl přijat od 3 šlechtitelských stanic v České republice:

- Chlumec- Selgen a.s., šlechtitelská stanice Chlumec nad Cidlinou
- Opava- OSEVA PRO s.r.o., Výzkumný ústav olejnin Opava
- Slapy- SEMPRA PRAHA a.s., šlechtitelská stanice Slapy u Tábora

Jako materiál pro izolaci byly obdrženy zmražené listy mladých rostlin. Přesný popis všech vzorků je znázorněn v následující tabulce. Pro hodnocení byly použité české i zahraniční odrůdy, novošlechtění a šlechtitelské materiály.

Tabulka č. 4: Seznam materiálů pro tvorbu mapy genetické diverzity 2017

Pořadí	Materiál	Stanice
1	Sidney	Chlumec
2	Diego	Chlumec
3	Arabella	Chlumec
4	Orex	Chlumec
5	Vapiano	Chlumec
6	Zakari CS	Chlumec
7	C 175	Chlumec
8	C 364	Chlumec
9	C 1694	Chlumec
10	C 3154	Chlumec
11	C 349	Chlumec
12	C 127	Chlumec
13	C 77	Chlumec
14	C 356	Chlumec
15	Cortes	Chlumec
16	Rescator	Chlumec
17	Stanley	Chlumec
18	Marley	Chlumec
19	CH 1	Chlumec
20	CH 2	Chlumec
21	CH 3	Chlumec
22	CH 4	Chlumec
23	CH 5	Chlumec
24	CH 6	Chlumec
25	CH 7	Chlumec

26	CH 8	Chlumec
27	CH 9	Chlumec
28	CH 10	Chlumec
29	OP-BN-51	Chlumec
30	RAW 1165-095	Chlumec
31	SL 841	Chlumec
32	RAW 1131-037	Chlumec
33	RAW 1194-006	Chlumec
34	RAW 1175S-035	Chlumec
35	SL 848	Chlumec
36	SL 853	Chlumec
37	CH 1/15	Chlumec
38	CH 4/15	Chlumec
39	CH 5/15	Chlumec
40	SA 20822/13	Chlumec
41	AB 3	Chlumec
42	AB 28	Chlumec
43	AB 31	Chlumec
44	AB 33	Chlumec
45	CMS 13A	Chlumec
46	CMS 14A	Chlumec
47	CMS 15A	Chlumec
48	CMS 16A	Chlumec
49	CMS 17A	Chlumec
50	CMS 18A	Chlumec
51	MZ 33/16	Chlumec
52	MZ 35/16	Chlumec
53	MZ 37/16	Chlumec
54	MZ 38/16	Chlumec
55	MZ 39/16	Chlumec
56	MZ 41/16	Chlumec
57	MZ 42/16	Chlumec
58	MZ 44/16	Chlumec
59	MZ 47/16	Chlumec
60	MZ 48/16	Chlumec
61	NPZ 0711	Chlumec
62	NSL 10/214	Chlumec
63	ESC1132 (ES Valegro)	Opava
64	Orava	Opava
65	Ornamento	Opava
66	OP-BN-50	Opava
67	Mirage	Opava
68	Ladoga	Opava
69	Cadeli	Opava
70	Lohana	Opava
71	7867/5(MPZ 12 16/17)	Opava

72	Winner	Opava
73	8980/188 (MUTAGENEZE 15/16)	Opava
74	8986/242 (MUTAGENEZE 15/16)	Opava
75	č.k.41	Opava
76	č.k.42	Opava
77	Witt	Opava
78	Rf1-5878/2	Opava
79	Rf2-5986/3	Opava
80	Rf3-5942/2	Opava
81	5788/4 BC-OPUS	Opava
82	5790/2 BC-OPONENT	Opava
83	5792/2 BC-OKSANA	Opava
84	5793/1 BC-OP-BN-13	Opava
85	5795/1 BC-OP-BN-14	Opava
86	5797/2 BC-OP-BN-18	Opava
87	5799/4BC-OP-BN-16	Opava
88	5801/5 BC-OP-BN-21	Opava
89	5803/1 BC-OP-BN-20	Opava
90	5805/3 BC-OP-BN-19	Opava
91	5807/6 BC-OP-BN-24	Opava
92	5811/5 BC-OP-BN-26	Opava
93	5813/5 BC-OP-BN-17	Opava
94	5815/3 BC-OP-BN-29	Opava
95	5817/4 BC-OP-BN-30	Opava
96	5819/3 BC-OP-BN-31	Opava
97	5821/3 BC-OP-BN-32	Opava
98	5823/1 BC-OCEANIA	Opava
99	5826/3 BC-ORION	Opava
100	5828/2 BC-OP-BN-36	Opava
101	5830/3 BC-OP-BN-38	Opava
102	5832/6 BC-BN-OP-39	Opava
103	5834/4 BC-OP-BN-40	Opava
104	5836/1 BC-OP-BN-41	Opava
105	5838/2 BC-OP-BN-42	Opava
106	5840/6 BC-OP-BN-43	Opava
107	5842/6 BC-ODETA	Opava
108	5874/1 Rf-1	Opava
109	5874/2 Rf-1	Opava
110	5874/3 Rf-1	Opava
111	5874/4 Rf-1	Opava
112	5876/1 Rf-1	Opava
113	5876/2 Rf-1	Opava
114	5876/3 Rf-1	Opava
115	5876/4 Rf-1	Opava

116	5876/5 Rf-1	Opava
117	5878/1 Rf-1	Opava
118	5878/2 Rf-1	Opava
119	5878/3 Rf-1	Opava
120	5878/4 Rf-1	Slapy
121	MPZ 17/17	Slapy
122	MPZ 18/17	Slapy
123	MPZ 19/17	Slapy
124	MPZ 20/17	Slapy
125	MPZ 21/17	Slapy
126	MPZ 22/17	Slapy
127	MPZ 23/17	Slapy
128	MPZ 24/17	Slapy
129	MPZ 25/17	Slapy
130	MPZ 26/17	Slapy
131	MPZ 27/17	Slapy
132	MPZ 28/17	Slapy
133	MPZ 29/17	Slapy
134	MPZ 30/17	Slapy
135	MPZ 31/17	Slapy
136	MPZ 32/17	Slapy
137	SO1 Arot	Slapy
138	SO2 Sidney	Slapy
139	SO3 Diego	Slapy
140	SO4 Arbella	Slapy
141	SO6 OP-BN-51	Slapy
142	SO7 Zakari CS	Slapy
143	SO9 PT 242	Slapy
144	SO10 Vapiano	Slapy
145	SO11 CWH 319	Slapy
146	SO12 Archimedes	Slapy
147	SO13 NPZ 14004W15	Slapy
148	SO14 OP-4942	Slapy
149	SO15 DK platinium	Slapy
150	SO16 Mentor Lemic	Slapy
151	SO17 RNX 3421	Slapy
152	SO18 Alister	Slapy
153	SO19 C-815	Slapy
154	SO20 OP-4928	Slapy
155	SL-F2-1/17	Slapy
156	SL-F2-3/17	Slapy
157	SL-F2-5/17	Slapy
158	SL-F2-9/17	Slapy
159	SL-F2-11/17	Slapy
160	SL-F2-12/17	Slapy
161	SL-F2-15/17	Slapy

162	SL-F2-16/17	Slapy
163	SL-F2-18/17	Slapy
164	SL-F2-19/17	Slapy
165	SL-F2-20/17	Slapy
166	SL-F2-21/17	Slapy
167	SL-F2-22/17	Slapy
168	SL-F2-23/17	Slapy
169	SL-F2-25/17	Slapy
170	SL-F2-27/17	Slapy
171	SL-F2-29/17	Slapy
172	SL-F2-35/17	Slapy
173	SL-F2-38/17	Slapy
174	SL-F2-40/17	Slapy
175	SL-F2-43/17	Slapy
176	SL-F2-46/17	Slapy
177	SL-F2-49/17	Slapy
178	SL-F2-52/17	Slapy
179	SL-F2-59/17	Slapy
180	SL-F2-60/17	Slapy

4.2. Izolace DNA

DNA u řepky olejné lze izolovat z listového materiálu a to z děložních lístků, popřípadě z plně vyvinutých pravých listů. Dále je možná izolace z materiálu čerstvého nebo zmrazeného.

Izolace DNA výše zmíněných vzorků byla provedena ze zamrazených plně vyvinutých pravých listů řepky olejné. Rostlinná DNA byla izolovaná modifikovanou metodou CTAB (Williams a kol. 1992), vhodnou pro rostlinný materiál tohoto druhu.

4.2.1. Izolace DNA pomocí CTAB dle Williams - modifikace pro řepku

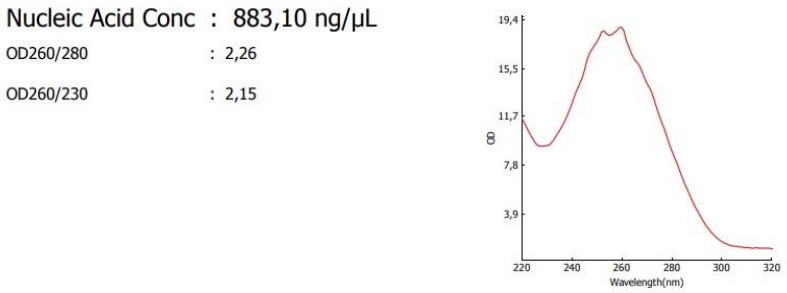
- Ve sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavkách zhomogenizovat 50-200 mg listu řepky pomocí homogenizační tyčinky
- Přidat 500 µl extrakčního pufru (2% CTAB+ ß-merkaptoethanol) předehřátého na 65^{o}C, homogenizovat tkáň a promíchat s pufrem
- Inkubovat při 65^{o}C ve vodní lázni 5 minut, jednou promíchat během inkubace

- Přidat 500 µl směsi chloroformu-IAA, 5 minut protřepat
- Centrifugovat na maximum (14 000 rpm) 5 minut při pokojové teplotě (21^{o}C)
- Přepipetovat vodní fázi do nové mikrocentrifugační zkumavky
- Přidat 2/3 objemu isopropanolu (cca 250 µl), 2-3 lehce promíchat
- Vložit na 5 minut do mrazáku (-20 ^{o}C)
- Centrifugovat na maximální rychlost 5 minut při 4 ^{o}C
- Odstranit supernatant a přidat 1 ml ledového 70 % etanolu
- Centrifugovat na maximální rychlost 5 minut při 4 ^{o}C
- Odstranit supernatant, vysušit pelet
- Přidat 70 µl TE pufru a nechat v uzavřených mikrocentrifugačních zkumavkách třepat při 37^{o}C, kdy dojde k rozpuštění DNA
- DNA uchovat při -20 ^{o}C

4.3. Měření koncentrace DNA

Pro zjištění koncentrace DNA a dalších parametrů se používá mnoho přístrojů či metod. Izolovaná DNA z výše měřených vzorků byla měřena na přístroji BioSpec Nano od společnosti Shimadzu.

- Na detekční destičku jsme napipetovali 1 µl TE pufru jako slepý vzorek
- Poté jsme na stejné místo pipetovali vždy 1 µl vzorku a přístroj změřil koncentraci DNA



Obr. č. 4: Příklad výsledku z BioSpec Nano

Na obrázku č. 4 je výsledek koncentrace ds DNA u vzorku č. 51. Vpravo je vypracovaný graf, kdy na ose X je vlnová délka v nanometrech na ose Y číslo OD. Vlevo je vypsaná koncentrace nukleové kyseliny, v tomto případě 883,10 ng / µl.

Pod ním je číslo OD 260/280, značící podíl absorbance při 260 nm a 280 nm a hodnotící čistotu izolátu. Optimálně by se měl pohybovat okolo 2, pokud je poměr nižší než 1,8 může to znamenat přítomnost bílkovin nebo jiných kontaminantů. Číslo OD 230/260 se používá jako sekundární míra čistoty, měla by se pohybovat v rozmezí 2,0 – 2,2. Pokud je výrazně nižší může to předpovídat přítomnost kontaminantů.

4.4. Přečištění DNA

V některých případech je i přes vysokou koncentraci DNA ve směsi mnoho příměsí, které dále brání správnému průběhu PCR a následné elektroforézy.

Přečištění vzorků:

- Do mikrocentrifugačních zkumavek napipetovat 20µl DNA, 2 µl acetátu sodného a 50 µl etanolu (96 %)
- Promíchat a nechat 10 – 15 minut při laboratorní teplotě
- Centrifugovat při 13 000 rpm, 30 minut
- Opatrně odstranit etanol
- Přidat 250 µl etanolu (70 %) a promíchat
- Centrifugovat při 13 000, 15 minut
- Opatrně vylít etanol
- Přidat 250 µl etanolu (70 %) a promíchat
- Centrifugovat při 13 000, 15 minut
- Dokonale odstranit etanol a vysušit
- Rozpustit v TE pufru

4.5. PCR

Optimalizace primerů

Celkové množství v jedné reakci je 10 µl. Reakce probíhala na přístroji Termocykler Bioer. Primery byly optimalizované pomocí gradientové PCR, kdy se teploty nasedání primeru v jednotlivých sloupcích pohybovaly od 48 ^{o}C do 58 ^{o}C.

- 5 µl Master Mix
- 0,25 µl Primer
- 0,20 µl BSA

- 3,55 µl H_2O
- 1 µl DNA

Cyklus:

Počáteční denaturace		2 min	95 °C
40 cyklů	Denaturace	20 s	93 °C
	Annealing	1 min	48 - 58 °C
	Elongace	20 s	72 °C
Konečná elongace		6 min	72 °C
Uchování		-	4 °C

Tabulka č. 5: Teploty primerů

1.	**2.**	**3.**	**4.**	**5.**	**6.**	**7.**	**8.**	**9.**	**10.**	**11.**	**12.**
48 °C	48,2 °C	48,6 °C	49,5 °C	50,6 °C	52 °C	53,7 °C	55,1 °C	56,2 °C	57,2 °C	57,7 °C	58 °C

PCR

Celkové množství v jedné reakci je 10 µl.

- 5 µl master mix 2xPPP (TopBio)
- 0,25 µl Primer (10 µM)
- 0,20 µl 10xBSA
- 3,55 µl dH_2O (voda do objemu 10 µl)
- 1 µl DNA

Teplotní profil

Počáteční denaturace		2 min	95 °C
40 cyklů:	Denaturace	20 s	93 °C
	Annealing	1 min	48 - 52 °C (dle příslušného primeru)
	Elongace	20 s	72 °C
Konečná elongace		6 min	72 °C
Uchování		-	4 °C

Použité primery:

Tabulka č. 6: UBC primery: 812, 840, 845, 880 byly vybrány jako nejvhodnější primery pro použití k hodnocení genetické diverzity

Primer	Sekvence primeru ´5-3´	annealing
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	52 ^{o}C
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52 ^{o}C
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52 ^{o}C
UBC 826	ACACACACACACACACC	52 ^{o}C
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA	52 ^{o}C
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	52 ^{o}C
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	52 ^{o}C
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	52 ^{o}C
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	52 ^{o}C
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	52 ^{o}C
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	52 ^{o}C
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	52 ^{o}C

Reakce probíhala na přístroji Termocykler Bioer

4.6. Příprava agarozového gelu

PCR produkty se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru.

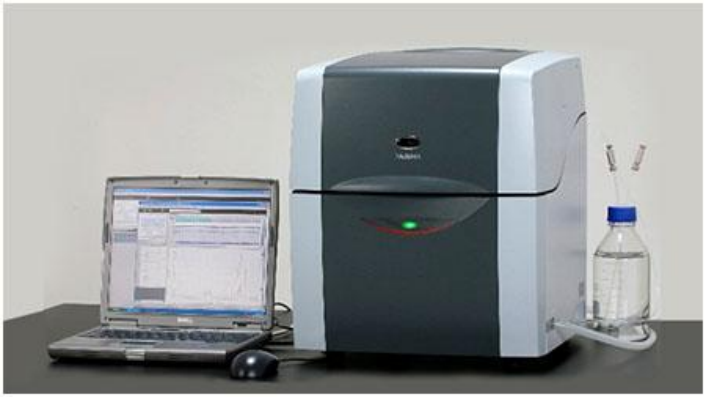
- Navážit 3,2 g agarosy
- Přidat 170 ml TBE, promíchat
- Rozpustit agarozu v mikrovlnné troubě
- Zchladit pod tekoucí vodou na 60 ^{o}C a přidat 6 µl ethidium bromidu a nalít do předem připravené vany s hřebínkem
- Nalitý agarozový gel nesmí obsahovat vzduchové bubliny
- Po ztuhnutí gelu vyndat hřebínek, který v gelu vytvoří sloty

4.7. Gelová elektroforéza

- Připravený gel vložit do elektroforetické vany obsahující TBE pufr
- Napipetovat opatrně vzorky do slotů
- Připojit elektroforetickou vanu k napájecímu zařízení
- Zapnout vanu na 40 V po dobu 5 min
- Poté zapnout na 135 V po dobu 1 hod 55 min
- Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vyzualizují barvením pomocí ethidium bromid pod UV světlem

4.8. Čipová elektroforéza

Pro porovnání gelové a čipové elektroforézy byla použita čipová elektroforéza MultiNa od Shimadzu zobrazená na obrázku č. 5. MultiNa pracuje na jednom až čtyřech čipech, což je výhodné pro zrychlení analýzy. Najednou dokáže vyhodnotit až 98 vzorků (Shimadzu, 2004).



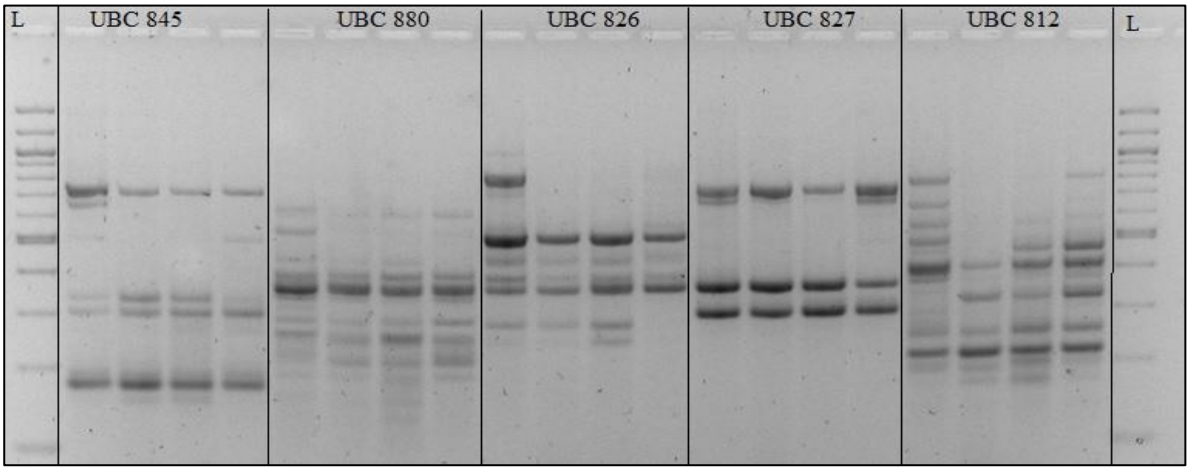
Obr. č. 5: Čipová elektroforéza MultiNa od Shimadzu (Shimadzu, 2004)

5. Výsledky práce

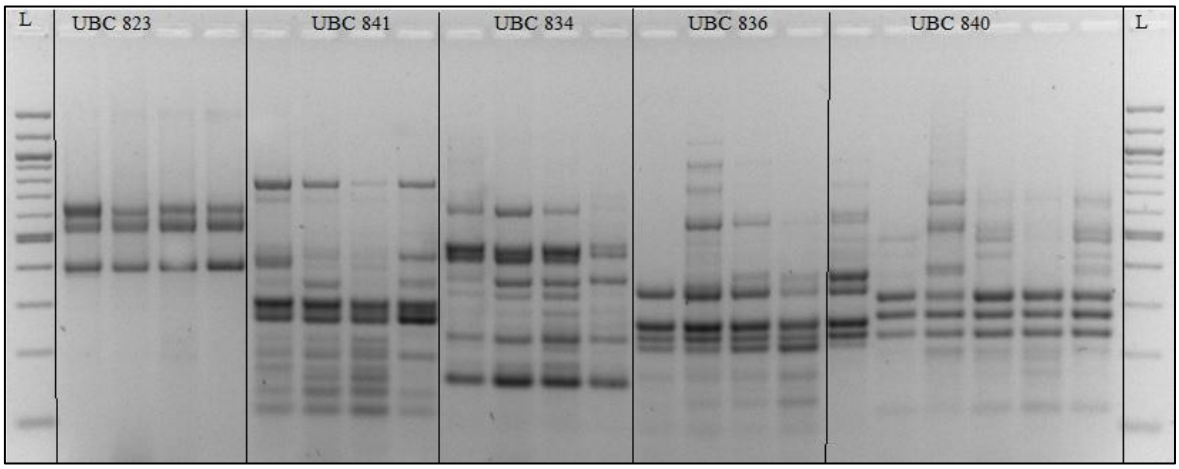
5.1. Primery vhodné pro řepku

5.1.1. Testování UBC primerů

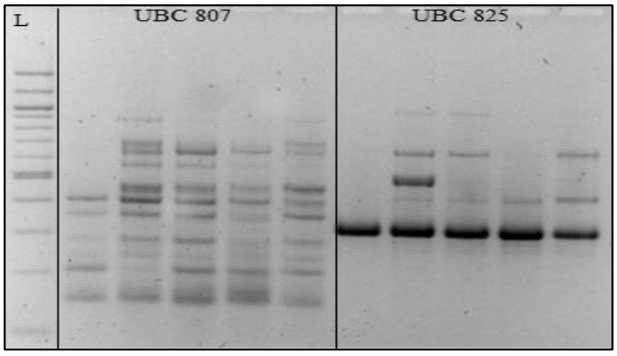
Pro výběr primerů pro řepku bylo použito 12 UBC primerů: UBC 845; UBC 880; UBC 826; UBC 827; UBC 812; UBC 823; UBC 841; UBC 834; UBC 836; UBC 840; UBC 807 a UBC 825. Na vyzkoušení vhodnosti daného primeru pro hodnocení genetické diverzity řepky byly použity nejméně čtyři odlišené druhy řepky (viz obrázek č. 6, č. 7 a č. 8). L značí 100 bp ladder (marker).



Obr. č. 6: Výsledek elektroforézy pro zkoušku primerů



Obr. č. 7: Výsledek elektroforézy pro zkoušku primerů



Obr. č. 8: Výsledek elektroforézy pro zkoušku primerů

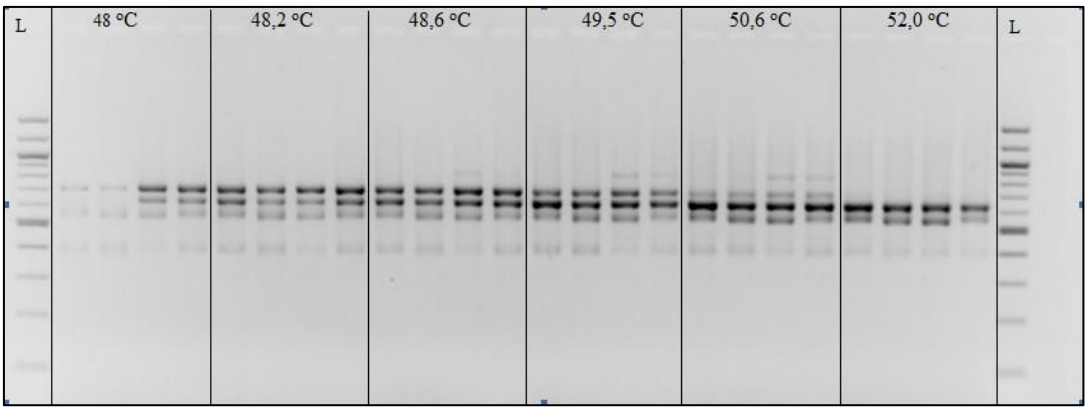
Primery UBC 823, UBC 827 a UBC 825 vykazovaly příliš nízkou variabilitu pro studium genetické variability řepky, zároveň byl primer UBC 825 při dalších analýzách vysoce nestabilní. UBC primer 841 při následné gradientové PCR vykazoval rovněž nízkou variabilitu.

Jako vhodné primery pro studium genetické variability u řepky byly vybrány primery UBC 812, UBC 840, UBC 845 a UBC 880. Zároveň by bylo možné použít primery UBC 834, UBC 836 a UBC 807, které vykazovaly dostatečnou variabilitu i stabilitu při následné gradientové PCR.

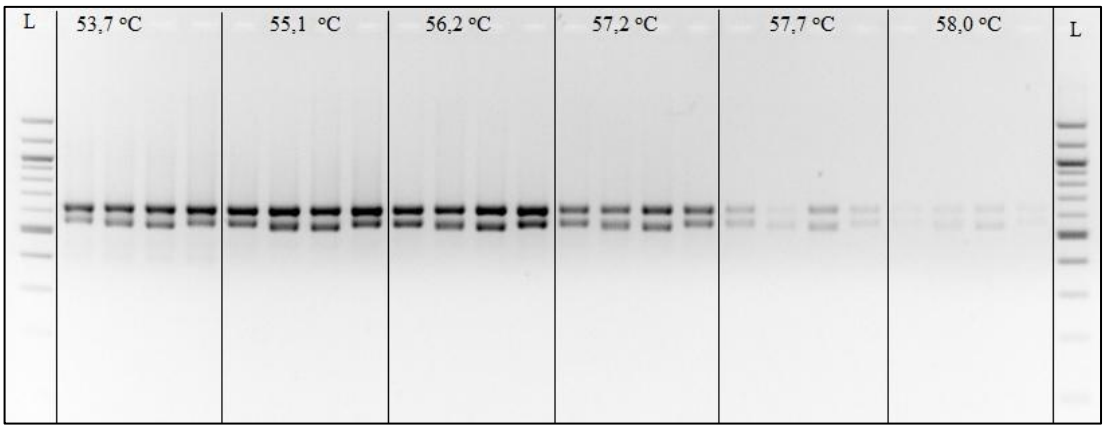
5.1.2. Gradientová PCR

Další zkouškou pro výběr vhodných primerů byla gradientová PCR pro zjištění optimální teploty annealingu (nasedání primeru).

Na obrázku č. 9 a č. 10 je testování gradientové PCR u primeru UBC 823. Pro analýzu byly použity 4 odlišné druhy řepky a 12 rozdílných teplot pro nasedání primeru. Nejvhodnější teplota annealingu u primeru UBC 823 je 49,5 ^{o}C, kdy jsou nejlépe rozlišitelné jednotlivé bandy. Tento primer však nebyl vybrán pro zjištění genetické diverzity u řepky, kvůli nízké variabilitě.

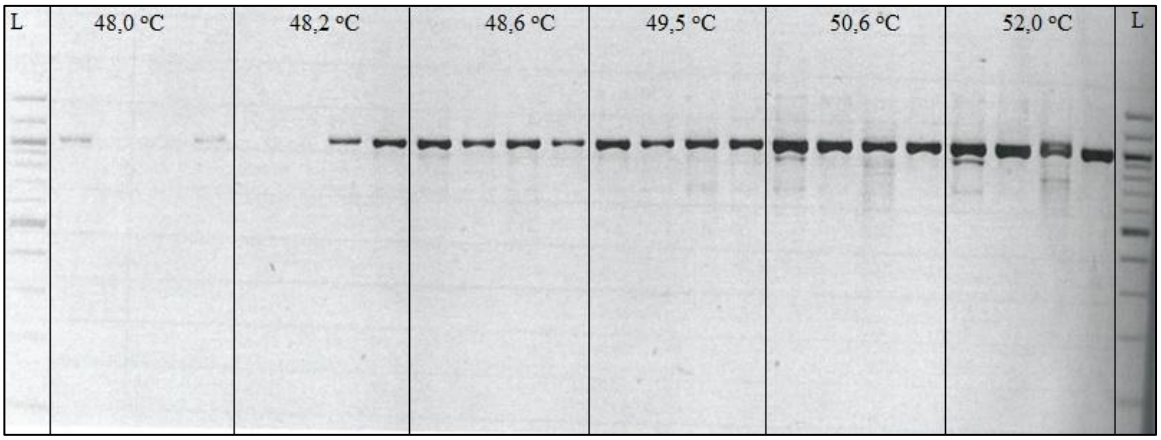


Obr. č. 9: Gradientová PCR u primeru UBC 823

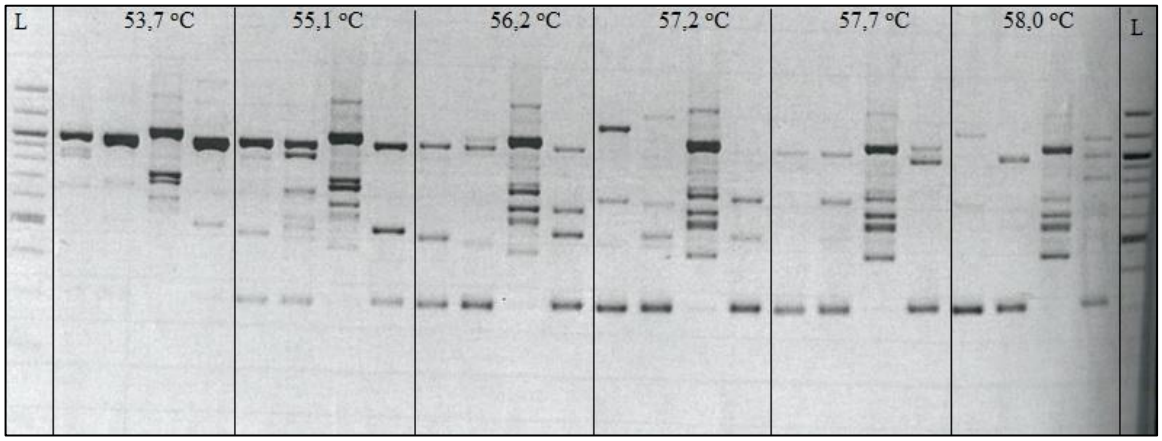


Obr. č. 10: Gradientová PCR u primeru UBC 823

Na obrázku č. 11 a č. 12 je gradientová PCR u primeru UBC 825. Optimální teplota pro nasedání primerů je 55,1 ^{o}C, kdy jsou nejlépe rozpoznatelné a nejostřejší bandy. Tento primer však nebyl použit pro studium genetické diverzity kvůli nízké stabilitě.



Obr. č. 11: Gradientová PCR u primeru UBC 825



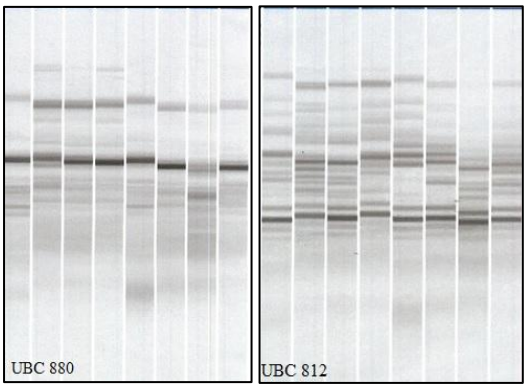
Obr. č. 12: Gradientová PCR u primeru UBC 825

Nejvhodnější čtyři primery pro studium genetické diverzity byly vybrány primery: UBC 812, UBC 840, UBC 845 a UBC 880. Vykazovaly stabilitu a potřebnou variabilitu pro další analýzu.

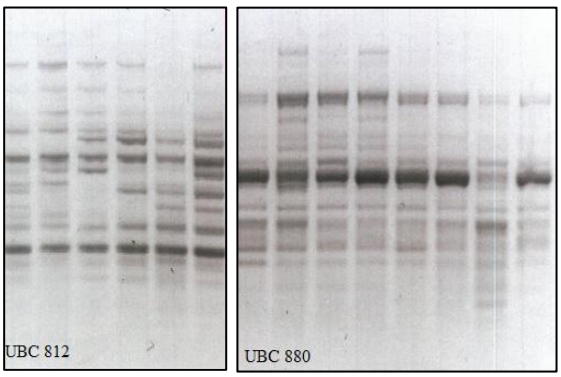
5.2. Porovnání čipové a gelové elektroforézy

Pro porovnání čipové (obr. č. 13) a gelové elektroforézy (obr. č. 14) byly použity UBC primery 812 a 880. Vzorky byly analyzovány na čipové elektroforéze MultiNa od značky Shimadzu na čtyřech čipech.

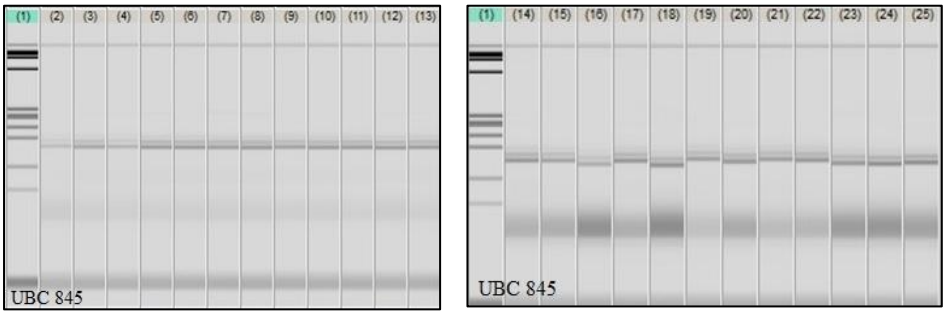
U čipové elektroforézy jsou lépe rozpoznatelné bandy jednotlivých vzorků. Na obrázku č. 13 je patrné, že počátky vzorků se liší. Tento problém je možné vyřešit zředěním vzorků na stejnou koncentraci 100 ng/ul. Na obrázku č. 15 je porovnání zředěných a nezředěných vzorků UBC primeru 845 pomocí čipové elektroforézy. Analýza proběhla na jednom čipu.



Obr. č. 13: Čipová elektroforéza



Obr. č. 14: Gelová elektroforéza



Obr. č. 15: Porovnání zředěných vzorků (vlevo) a nezředěných vzorků (vpravo) na čipové elektroforéze

Pro studium genetické diverzity řepky byla použita gelová elektroforéza, protože byla oproti čipové elektroforéze (na 4 čipech, nezředěných vzorků) přesnější. Čipová elektroforéza je levnější, ovšem z důvodu potřeby výměny čipů byl běh naopak dražší.

5.3. Výsledky pro jednotlivé primery

V tabulce č. 7 jsou shrnuty jednotlivé výsledky pro vybrané primery. Obsahuje sekvence primeru, nejoptimálnější teplotu annealingu zjištěnou díky gradientové PCR. Dále je v tabulce celkový počet fragmentů a počet fragmentů polymorfních v jednotlivých znacích. V posledním sloupci je vypsané rozpětí fragmentů v „bp“, neboli párů bází.

Tabulka č. 8: Výsledky pro primery

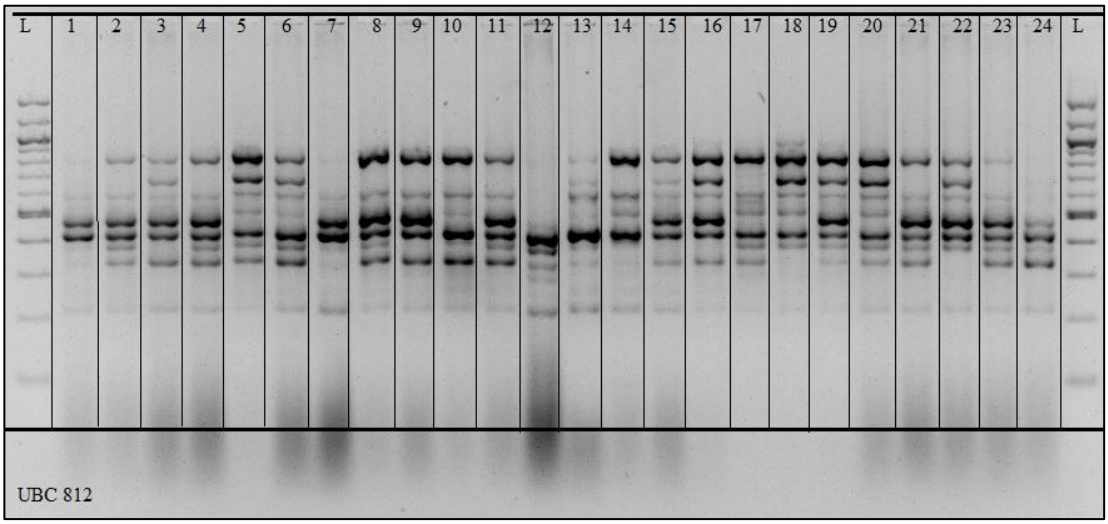
Primer	Sekvence	Teplota nasednutí primeru	Fragmenty	Variabilní fragmenty	Velikost (bp)
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	52 °C	15	13	170 - 900
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	52 °C	13	11	250 - 800
UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52 °C	13	12	200 - 1000
UBC 880	GGAGAGGAGAGGAGA	52 °C	19	18	250 - 1000

5.4. Ukázka binární matice

Na obr. č. 20 je znázorněná binární matice u UBC primeru 812 pro vzorky 1 – 24 podle gelové elektroforézy (viz obr. 21)

	Sidney	Diego	Arabella	Orex	Vapiano	Zakari CS	C 175	C 364	C 1694	C 3154	C 349	C 127	C 77	C 356	Cortes	Rescator	Stanley	Marley	CH 1	CH 2	CH 3	CH 4	CH 5	CH 6
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
6	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
8	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Obr. č. 20: Ukázka binární matice primeru UBC 812 u vzorků 1 - 24



Obr. č. 21: Fotka z gelové elektroforézy primeru UBC 812 u vzorků 1 - 24

5.5. Výsledky ISSR analýz

Pro analýzu genetické diverzity řepky pro rok 2017 bylo převzato 180 vzorků. Do analýzy bylo zahrnuto 179 vzorků, protože u vzorku č. 90 nebylo možné provést skórování ani po opakované PCR reakci.

Celkem byly použity 4 UBC primery: 880, 840, 845, 812. Počty jednotlivých fragmentů jsou popsány v tabulce č. 6. Na základě získaných fragmentů byla vytvořena matice nepřítomnosti (0) a přítomnosti (1) jednotlivých fragmentů u všech 179 vzorků. Data byla následně vyhodnocena v programu MVSP a byla vypočtena matice podobnosti mezi jednotlivými odrůdami a graf pro PCO analýzu.

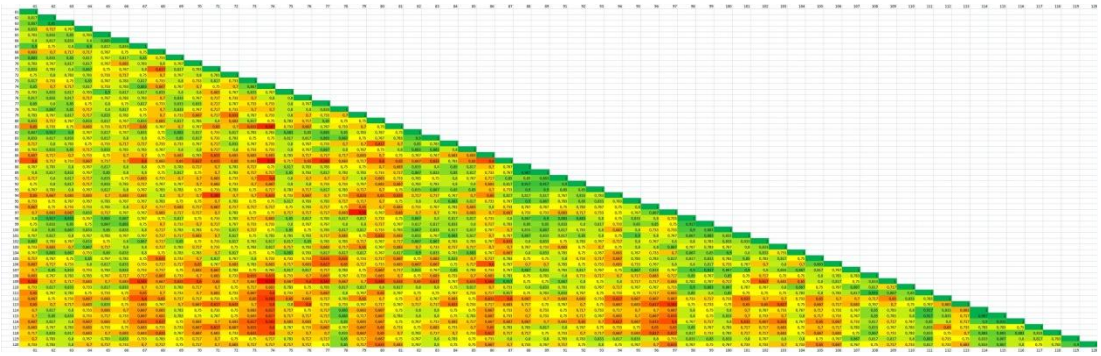
Matice byly vytvořeny pro jednotlivé šlechtitelské stanice zvlášť. Celkem byly provedeny 4 analýzy, kdy na základě vypočtených matic je možné zvolit křížení jak mezi jednotlivými stanicemi, tak v rámci každé šlechtitelské stanice.

Tabulka č. 7: počty fragmentů u primerů

Primer	**Počet fragmentů**
840	13
812	13
880	19
845	15

5.5.1. Výsledky pro šlechtitelskou stanici Opava

Celkový počet analyzovaných vzorků šlechtitelské stanice OSEVA PRO s.r.o. byl 59. Jednotlivé vzorky nikdy nevykazovaly 100% shodu. Maximální hodnota 0,967, tedy 96,7 % shoda se vyskytovala mezi vzorky č. 88 a č. 89 a zároveň mezi vzorky č. 114 a č. 115. Naopak nejnižší hodnota 0,533, tedy 53,3 % shoda byla analyzována mezi vzorky č. 74 a č. 109.



Obr. č. 16: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky ze šlechtitelské stanice Opava. Červená barva označuje hodnotu shody od 0,5 – 0,73 (tedy vzorky s nejnižší shodou); žlutá barva označuje hodnotu shody od 0,74 – 0,98 a vzorky zelené jsou vzorky s nejvyšší shodou

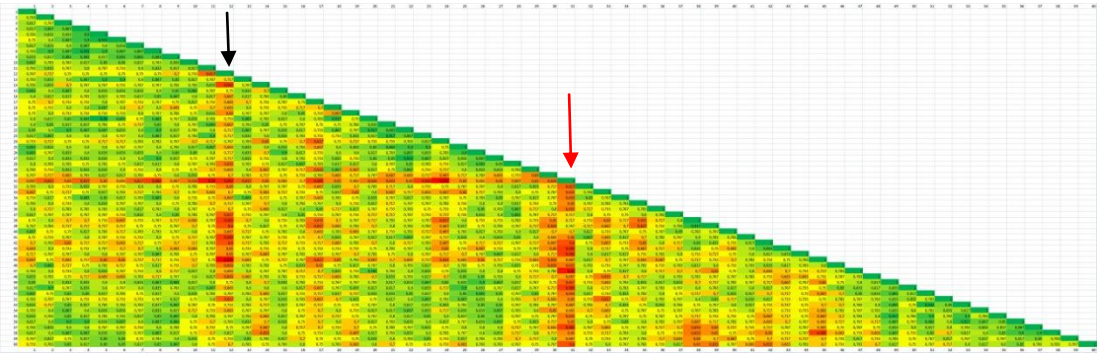
Na obrázku č. 16 je barevné znázornění vzorků 61 - 120. Podle barev je viditelná shoda, nebo naopak nejnižší shoda genetického založení jednotlivých odrůd. Červená barva označuje vzorky s nejnižší shodou, tudíž nejvíce variabilní a nejlépe vhodné pro další šlechtění.

Naopak zelenou barvou jsou znázorněny vzorky s nejvyšší shodou, jsou to tedy vzorky málo variabilní s nízkým potenciálem použití do dalšího šlechtění.

Ani jeden vzorek neprokázal 100 % shodu s jiným a podle barevného spektra lze usoudit, že vzorky z této šlechtitelské stanice, v porovnání s ostatními, mají nejvyšší míru variability. Může to být způsobeno vysokým počtem rodičovských komponent používaných ve šlechtění nebo rodičovské komponenty s výrazně odlišnými znaky.

5.5.2. Výsledky pro šlechtitelskou stanici Chlumec

Celkový počet analyzovaných vzorků šlechtitelské stanice Selgen a.s. byl 60. Jednotlivé vzorky nikdy nevykazovaly 100% shodu. Maximální hodnota 0,95, tedy 95 % shoda se vyskytovala mezi vzorky č. 5 a č. 20. Naopak nejnižší hodnota 0,533, tedy 53,3 % shoda byla analyzována mezi vzorky č. 24 a č. 31 a zároveň mezi vzorky č. 12 a č. 45. Barevné znázornění vzorků je na obrázku č. 16.



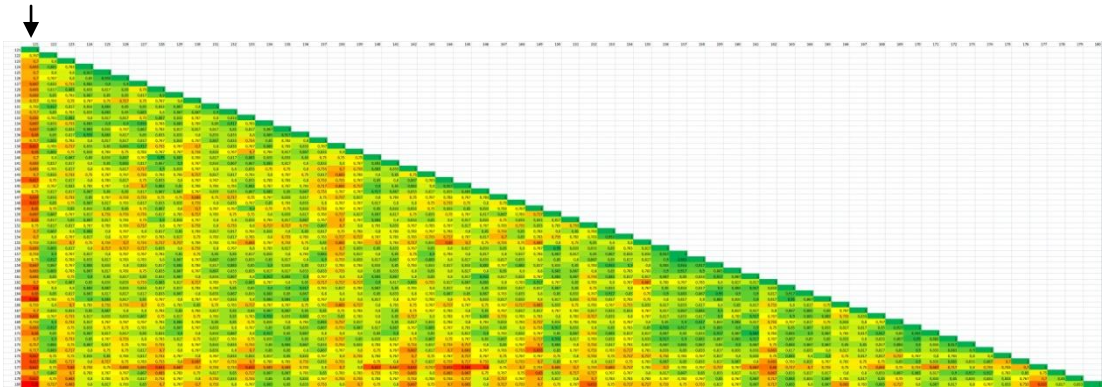
Obr. č. 17: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky ze šlechtitelské stanice Chlumec. Červená barva označuje hodnotu shody od 0,5 – 0,73 (tedy vzorky s nejnižší shodou); žlutá barva označuje hodnotu shody od 0,74 – 0,98 a vzorky zelené jsou vzorky s nejvyšší shodou

Na obrázku číslo 17 je barevné znázornění shody nebo naopak neshody jednotlivých vzorků 1 - 60. Červenou barvou jsou označené vzorky s nejnižší shodou, tudíž nejvyšší variabilitou a největším potencionálem využití při šlechtění. Dva nejvíce variabilní vzorky jsou označené šipkami. První vzorek označený černou šipkou je č. 17 a druhý označený červenou šipkou je vzorek č. 31 s průměrnou hodnotou shody 0,64.

Zelenou barvou jsou opět znázorněny vzorky s nejvyšší shodou. Oproti šlechtitelské stanici Opava vykazuje šlechtitelská stanice Chlumec nižší variabilitu, nachází se zde však vzorky vysoce variabilní a vhodné pro další šlechtění.

5.5.3. Výsledky pro šlechtitelskou stanici Slapy

Celkový počet analyzovaných vzorků šlechtitelské stanice Slapy u Tábora byl 60. Jednotlivé vzorky nikdy nevykazovaly 100% shodu. Maximální hodnota 0,983, tedy 98,3 % shoda se vyskytovala mezi vzorky č. 157 a č. 158. Naopak nejnižší hodnota 0,550, tedy 55,0 % shoda byla analyzována mezi vzorky č. 121 a č. 180. Barevné znázornění vzorků je na obrázku č. 17.



Obr. č. 18: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky ze šlechtitelské stanice Slapy. Červená barva označuje hodnotu shody od 0,5 – 0,73 (tedy vzorky s nejnižší shodou); žlutá barva označuje hodnotu shody od 0,74 – 0,98 a vzorky zelené jsou vzorky s nejvyšší shodou

Na obrázku č. 18 je zobrazená shoda a nejnižší hodnota shody u jednotlivých vzorků 121 - 180 ze šlechtitelské stanice Slapy. Na obrázku je vidět, že vzorek označený černou šipkou (vzorek č. 121) vykazuje nejvyšší míru variability s průměrnou hodnotou shody 0,68 a je tedy nejvhodnějším vzorkem pro další šlechtění.

Na první pohled je patrné, že velkou část zabírá žlutá a zelená barva, tedy vzorky s nízkou variabilitou.

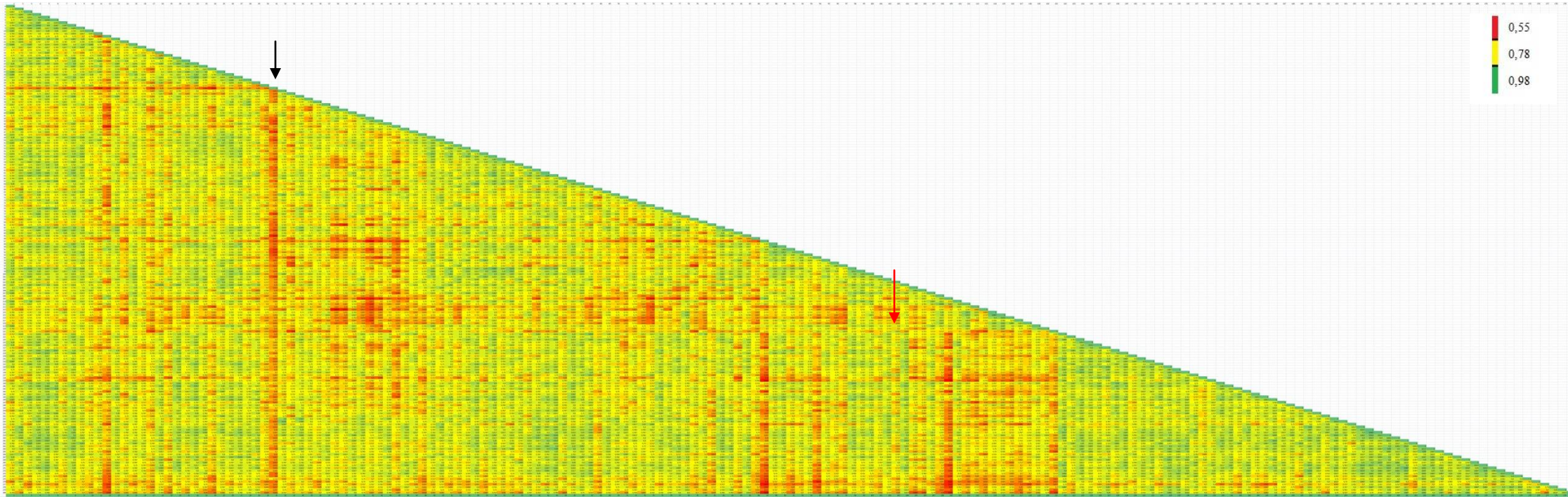
5.5.4. Celkový výsledek

Celkový počet analyzovaných vzorků 3 šlechtitelských stanic byl 179 vzorků. Žádná z kombinací nevykazovala 100% shodu. Maximální hodnota 0,983, tedy 98,3 % shoda se vyskytovala mezi vzorky č. 157 a č. 158. Naopak nejnižší hodnota 0,50, tedy 50 % shoda byla analyzována mezi vzorky č. 139 a č. 109.

Celkové barevné znázornění shody je zobrazeno na obrázku č. 19, kdy červeně jsou značené vzorky s nejnižší shodou (0,55), žlutě se střední (0,78) a zeleně vzorky nejvíce shodné (0,98).

Vzorek vykazující největší variabilitu je ze Šlechtitelské stanice Chlumec s číslem 31 (označený černou šipkou na obrázku). Zajímavá je oblast mezi černou a červenou šipkou, kde převažuje červená barva, tudíž vzorky s nejvyšší variabilitou a nejvhodnější pro další šlechtění.

Naopak u vzorků následujících po červené šipce převažuje žlutá až zelená barva. To značí, že vzorky mají nízkou diverzitu a nejsou tolik vhodné pro další použití ve šlechtění.



Obr. č. 19: : Barevně znázorněná shoda mezi vzorky u všech šlechtitelských stanic

6. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo pomocí metody ISSR odlišit od sebe 180 vzorků řepky olejné, výsledky předat šlechtitelům, kteří na jejich základě použijí nejodlišnější odrůdy do dalšího šlechtění.

DNA byla izolována ze zamražených lístků pomocí metody CTAB (Williams a kol., 1992) metodou modifikovanou pro řepku. Izolace pomocí CTAB je velice rychlá a levná, koncentrace DNA je dostačující pro další analýzy. Tuto metodu využil i Kresovich a kol. (1995) ve své práci na přítomnost opakování jednoduchých sekvencí (SSR) ve fragmentové knihovně řepky olejné. Také Li a Quiros (2001) využívají ve své práci sekvenčně příbuzný amplifikovaný polymorfismus (SRAP) izolaci pomocí CTAB.

Izolace metodou CTAB byla použitá v práci Costa a kol. (2016) při porovnání vhodnosti využití RAPD, ISSR a AFLP u *Dactylis glomerata* L. pro odhalení a klasifikaci genetického polymorfismu.

Dalšími možnostmi izolace DNA z rostlinného materiálu je použití komerčních kitů, jako jsou například *Invisorb Spin Plant Mini Kit* nebo *DNeasy Plant Mini Kit*, díky kterým se získá vysoce koncentrovaná a čistá DNA, ovšem izolace pomocí těchto kitů je velice drahá a DNA není příliš stabilní. Pro dlouhodobé uchování DNA není izolace pomocí kitu vhodná, DNA rychle degraduje.

Reddy a kol. (2002) považují ISSR jako metodu která je jednoduchá, rychlá a kombinuje většinu výhod mikrosatelitů (SSR), metody AFLP s univerzálností RAPD. Zatímco u SSR metody je potřeba znát předchozí znalost genomu, metoda ISSR používá mikrosatelitové sekvence jako primery PCR pro generování víceúčelových markerů. Je to metoda velice užitečná pro studium genetické diverzity, fylogeneze a evoluční biologie. Dle Dušínského a kol. (2006) je metoda ISSR hojně používaná pro studium genetické variability rostlin, také je možné ji použít i u některých druhů zvířat. Používá se u ptáků, některých savců nebo například u hmyzu.

Zietkiewics a kol. (1994) považuje metodu ISSR přesnější než metodu RAPD a zároveň tato metoda poskytuje větší polymorfismus. Je používaná u řady plodin pro posouzení genetické diverzity. Al-Turkj a Basahi (2015) zkoumali v Saudské Arábii genetickou rozmanitost u 27 odrůd rýže Hassawi s použitím 14 primerů. Díky vysokému polymorfismu u 11 primerů, od sebe mohli odlišit jednotlivé odrůdy.

Genetickou diverzitu u pšenice ze severozápadního Íránu pomocí metody ISSR zkoumali Sofalian a kol. (2008), kteří ve své studii použili 15 UBC primerů. Díky své analýze zjistili, že ISSR markery byly efektivní nástroj pro odhalení intra-specifické genetické diverzity u pšenice.

Bornet a Branchard (2004) použili metodu ISSR na detekci mikrosatelitů a studium genetické diverzity u *Brassica* a *Arabidopsis thaliana.* Podle tzv. trojúhelníku „U" je u rodu *Brassica* speciální vztah mezi 3 diploidními a 3 amfidiploidními genomy. Do studie použili 17 genotypů. Pro identifikaci a hodnocení vztahů mezi amfidiploidními a diploidními druhy trojúhelníku „U" bylo použito 18 primerů. Devět z nich neposkytlo žádné amplifikované fragmenty, nebo jen několik nespecifických produktů. Zbylých devět primerů bylo dále použito, protože vykazovaly vysokou variabilitu.

U řepky olejky na rozdíl od jiných zemědělsky důležitých plodin nemůžeme použít genetické zdroje od přírodních populací pro rozšíření genetické základny, při identifikaci genotypů se naráží na nedostatek variability na úrovni morfologických znaků. Proto jsou molekulární markery často používané jako účinný nástroj pro charakterizaci genotypů na molekulární úrovni (Li a kol., 2011).

V České republice se hodnocením genetické diverzity řepky olejky ozimé formy zabývala Havlíčková a kol. (2014). Porovnávali kolekce odrůd pomocí metod AFLP, SSR a ISSR a poté vyhodnocovali účinnost jednotlivých metod. V práci bylo použito 94 vzorků řepky olejky ozimé formy, které zahrnovaly krajové odrůdy, moderní a starší odrůdy nebo například liniové a hybridní odrůdy. Výsledky ISSR analýzy poskytly nejvýhodnější výsledky, vyznačovaly se nejvyšší mírou detekovatelného polymorfismu a vysokou citlivostí.

V diplomové práci byly použité vzorky ze šlechtitelských stanic Slapy u Tábora, Chlumec a Opava. Vzorky s nejnižší genetickou diverzitou se pocházely ze šlechtitelské stanice Slapy. Může to být způsobeno křížením geneticky podobných rodičovských komponent, což následně vedlo k zúžení genetického základu. Pro zvýšení diverzity je dobré použít ke šlechtění rodičovské komponenty s výrazně odlišnými znaky nebo použít větší počet rodičovských komponent. Do dalšího šlechtění je vhodné použít vzorek č. 31 ze šlechtitelské stanice Chlumec, který se vyznačoval nejvyšší mírou genetické odlišnosti v souboru sledovaných genotypů.

7. Závěr

Práce byla zaměřena na hodnocení genetické diverzity u 180 vzorků řepky poskytnuté od šlechtitelů ze tří šlechtitelských stanic Slapy, Opava a Chlumec. Pro ISSR analýzu byly vybrány 4 nejvhodnější UBC primery UBC 840, UBC 812, UBC 880 a UBC 845. Tyto primery byly vybrány pomocí gradientové PCR a vykazovaly největší variabilitu a stabilitu při práci s DNA řepky.

Celkem bylo testováno 12 UBC primerů, ze kterých bylo na základě jejich amplifikace, reprodukovatelnosti a stability vybrány 4 nejvhodnější. Tyto 4 primery celkem vytvářely 60 fragmentů, ze kterých bylo 54 fragmentů polymorfních.

Pro vizualizaci byla upřednostněna gelová elektroforéza před elektroforézou čipovou. Hlavním důvodem bylo, že výstupy z čipové elektroforézy, které byly ve formě elektroforeogramu nebylo možné hodnotit z důvodu odlišné délky jednotlivých fragmentů. Díky tomu, že bylo v průběhu hodnocení potřeba vyměnit čipy, se tato metoda oproti gelové elektroforéze výrazně prodražila. Výhodou stále zůstala práce bez ethidium bromidu.

Ze 180 vzorků bylo analyzováno pouze 179. Vzorek č. 90 ze šlechtitelské stanice Opava nebylo možné skórovat ani po opakované PCR reakci. U ostatních vzorků byla vytvořena matice přítomnosti a nepřítomnosti jednotlivých fragmentů. Díky programu MVSP byla vypočtena matice podobnosti jednotlivých odrůd na základě přítomnosti fragmentů, následně byl vytvořen graf pro PCO analýzu. Celkem byly provedeny 4 analýzy u 179 vzorků.

Ani u jedné stanice nevyšla stoprocentní shoda mezi vzorky, nejvyšší shoda se vyskytovala u šlechtitelské stanice Slapy, kde hodnota shody mezi vzorky č. 157 a č. 158 nabývala 98,3 %. Naopak nejnižší shoda mezi vzorky se vyskytovala u šlechtitelských stanic Opava (vzorky č. 74 a č. 109) a Chlumec (vzorky č. 24 a č. 31, zároveň u vzorků č. 12 a č. 45) s hodnotou shody 53,3 %.

Nejlépe byla vyhodnocena šlechtitelská stanice Opava, která měla vzorky prokazující nejvyšší diverzitu. Může to být způsobeno křížením vysoce odlišných rodičovských komponent.

Naopak nejhůře dopadla šlechtitelská stanice Slapy, u které se nacházel malý počet vzorků s vysokou diverzitou, kdy průměrná hodnota shody byla 0,806. Důvodem nízké genetické diverzity může být křížení rodičovských komponent

s málo odlišnými znaky nebo nízký počet rodičovských komponent použitých pro křížení.

U šlechtitelské stanice Chlumec se nacházely vzorky jak s vysokou diverzitou, tak i vzorky s diverzitou nízkou. V této šlechtitelské stanici se nachází zároveň vzorek č. 31 vykazující odlišnost od souboru analyzovaných vzorků.

Výsledky z analýz a jednotlivé grafy byly zaslány zpět do šlechtitelských stanic a byly použity jako podklad pro další křížení.

8. Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázky:

Obr. č. 1: Křížení rodu *Brassica*
Obr. č. 2: Porovnání metody SSR a ISSR
Obr. č. 3 : PCR amplifikace pomocí ISSR primerů
Obr. č. 4: Příklad výsledku z BioSpec Nano
Obr. č. 5: Čipová elektroforéza Multina od Shimadzu
Obr. č. 6: Výsledek elektroforézy pro zkoušku primerů
Obr. č. 7: Výsledek elektroforézy pro zkoušku primerů
Obr. č. 8: Výsledek elektroforézy pro zkoušku primerů
Obr. č. 9: Gradientová PCR u primeru UBC 823
Obr. č. 10: Gradientová PCR u primeru UBC 823
Obr. č. 11: Gradientová PCR u primeru UBC 825
Obr. č. 12: Gradientová PCR u primeru UBC 825
Obr. č. 13: Čipová elektroforéza
Obr. č. 14: Gelová elektroforéza
Obr. č. 15: Porovnání zředěných vzorků (vlevo) a nezředěných vzorků (vpravo) na čipové elektroforéze
Obr. č. 16: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky ze šlechtitelské stanice Opava
Obr. č. 17: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky ze šlechtitelské stanice Chlumec
Obr. č. 18: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky ze šlechtitelské stanice Slapy
Obr. č. 19: Barevně znázorněná shoda mezi vzorky u všech šlechtitelských stanic
Obr. č. 20: Ukázka binární matice primeru UBC 812 u vzorků 1 – 24
Obr. č. 21: Fotka z gelové elektroforézy primeru UBC 812 u vzorků 1 - 24

Tabulky:

Tabulka č. 1: Stručný přehled šlechtění řepky
Tabulka č. 2: Srovnání odlišných typů genetických markerů
Tabulka č. 3: Porovnání DNA markerů
Tabulka č. 4: Seznam materiálů pro tvorbu mapy genetické diverzity 2017
Tabulka č. 5: Teploty primerů
Tabulka č. 6: UBC primery: 812, 840, 845, 880
Tabulka č. 7: Počty fragmentů u primerů
Tabulka č. 8: Výsledky pro primery

Grafy:

Graf č. 1: Průměrné sklizňové plochy olejnin v ČR v letech 2014- 2016

9. Použitá literatura

ABBAS S. J., FARHATULLAH K. B. MARWAT, KHAN I. A., MUNIR I. (2009). Molecular analysis og genetic diversity in Brassica species. *Pakistan Journal of Botany*. 2009, **41**(1), 167-176.

AL-TURKJ, T. A., BASAHI M. A. (2015). Assessment of ISSR based molecular genetic diversity of Hassawi rice in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **22**(5), 591–599. http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.027

BARANYK P. (2013). Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2013/14 Seznam doporučených odrůd: Výsledky pokusů: Poloprovozní odrůdové pokusy SPZO, Státní odrůdové zkoušky ÚKZÚZ, Seznam doporučených odrůd, Odrůdy v praxi. *Praha: Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin*. ISBN 978-80-87065-45-7.

BARANYK P. (2016). Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2017/18 Seznam doporučených odrůd: Výsledky pokusů: Poloprovozní odrůdové pokusy SPZO, Státní odrůdové zkoušky ÚKZÚZ, Seznam doporučených odrůd, Odrůdy v praxi. *Praha: Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin*. ISBN 978-80-87065-72-3

BARANYK, P. (1994). Základy pěstování řepky ozimé. *Praha*: Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství České republiky, ISBN 80-7105-065-2.

BARANYK, P., FÁBRY A. (2007). Řepka: pěstování, využití, ekonomika. *Praha: Profi Press*, 2007. ISBN 9788086726267.

BARANYK P., HÁJKOVÁ M., HAVEL J., KAZDA J., LOŠÁK T., MÁLEK B., MARKYTÁN P., PLACHKÁ E., RICHTER R.,.., ZELENÝ V. (2010). Olejniny. *Praha: Profi Press*. ISBN 9788086726380.

BEČKA, D. (2007). Řepka ozimá: pěstitelský rádce. *Praha*: Pro katedru rostlinné výroby, FAPPZ, ČZU v Praze vydalo vydavatelství Kurent. ISBN 9788087111055.

BORNET B., BRANCHARD M. (2004). Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and Arabidopsis thaliana. *Hereditas*, **140**(3), 245-247. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2004.01737.x. ISSN 00180661.

CALISKAN M. (2012). Genetic Diversity in Plants. *InTech*. ISBN 978-953-51-0185-7.

COSTA R., PEREIRA G., GARRIDO I., TAVARES-DE-SOUSA M. M., ESPINOSA F., ESPINOSA F. (2016). Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (Dactylis glomerata L.) Germplasm Variations. DOI: 10.1371/journal.pone.0152972

DUŠINSKÝ R., KÚDELA M., STLOUKALOVÁ V., JEDLIČKA L. (2006). Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia*, Volume 61, Issue 3, pp 299 – 304. DOI: 10.2478/s11756-006-0055-3

EHRENBERGEROVÁ J. (2014). Odrůdy, osivo a sadba. Brno: *Mendelova univerzita v Brně*. ISBN 978-80-7509-003-4.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations: Biodiversity [online]. Rome, 2018 [cit. 2018-01-27]. Dostupné z: http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en/

GRAMAN J., ČURN V. (1997). Šlechtění rostlin: (obecná část). *České Budějovice: Jihočeská univerzita*. ISBN 80-7040-255-5.

HÁJKOVÁ P., HRUBÝ J., ČURN V., ŽALOUDKOVÁ J. (2006). Transgenní řepka olejka (Brassica napus L.): její monitoring, molekulární detekce a vliv agrotechniky na eliminaci výdrolu. [cit. 2018-03-02]. Dostupné z: http://www.vupt.cz/content/files/pub_06/haj_06_01.pdf

HASAN M., SEYIS F., BADANI A. G., PONS-KÜHNEMANN J., FRIEDT W., LÜHS W., SNOWDON R. J. (2006). Analysis of Genetic Diversity in the Brassica napus L. Gene Pool Using SSR Markers. *Genetic RESOURCES AND Crop Evolution,* Volume 53, Issue 4, pp 793 – 802. DOI: 10.1007/s10722-004-5541-2. ISBN 10.1007/s10722-004-5541-2.

HAVLÍČKOVÁ L., JOZOVÁ E., RYCHLÁ A., KLÍMA M., KUČERA V., ČURN V. (2014). Genetic diversity assessment in winter oilseed rape (Brassica napus L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 50: 216–225.

HEJNÝ S., SLAVÍK B. (2003). Květena 3, Acamdemia 2003, Praha, ISBN 80 -200 – 1090 - 4

CHLOUPEK O. (2000). Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Vyd. 2. *Praha: Academia*, 2000. ISBN 8020007792.

KEW (2016). The States of the World´s Plant Report. *Royal Botanic Gardens: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens*. ISBN 978-1-84246-628-5.

KOH H., KWON S., THOMSON M. (2015). Current technologies in plant molecular breeding: a guide book of plant molecular beeding for researchers. *Dordrecht: Springer*, 2015. ISBN 978-94-017-9995-9.

KRESOVICH S., SZEWC-McFADDEN A.K., BLIEK S.M., McFERSON J.R. (1995). Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolates from a size-fractionated genomic library of Brassica napus L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet*. 91: 206-211.

KUMAR P., GUPTA V.K., MISRA A.K., PANDEY B.K. (2009). Potentional of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Platnt Omics Journal*. 2009, **2009**(2(4), 141-162. ISSN 1836-3644.

LI G., QUIROS C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica.*Theoretical and Applied Genetics,*Volume 103, Issue 2-3, pp 455 - 461. DOI: 10.1007/s001220100570. ISBN 10.1007/s001220100570.

LI L., WANAPU C., HUANG X., HUANG T., LI Q., PENG Y., HUANG G. (2011): Comparison of AFLP and SSR for genetic diversity analysis of Brassica napus hybrids. *Journal of Agricultural Science*, 3: 101–110.

LIU A, WANG J. (2006). Genomic Evolution of Brassica Allopolyploids Revealed by ISSR Marker. *Genetic Resources and Crop Evolution* [online]. **53**(3), 603-611 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1007/s10722-004-2951-0.

LUIJEN S.H., de JONG T.J. (2010). A baseline of the distribution and morphology og Brassica napus L. and Brassica rapa L. in the Netherlands. University Leiden, *COGEM Report*, 2010: 3

MATTHES M. C., DALY A., EDWARDS K.J. (1998) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, Cambridge, Vol.1, 99: 183-190

NG W. L., TAN S. G.(2015). Inter- Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*. 2015, **9**(1), 30-39.

PLIESKE J., STRUSS D. (2001). Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. I. development in Brassica napus and abundance in Brassicaceae species, *Theor Appl Genetics,* Volume 102, pp 689-694, DOI: 10.1007/s001220051698

POWELL W., MACHRAY G. C., PROVAN J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Tren Plant Sci* 1:215-222

RAMAN H., RAMAN R., NELSON M. N., ASLAM M. N., RAJASEKARAN R., WRATTEN N., WALLANCE A., KILIAN A., SHARPE A.G., SCHONDELMAJER J. (2012). Diversity Array Technology Markers: Genetic Diversity Analyses and Linkage Map Construction in Rapeseed (Brassica napus L.). *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes,* 19(1), 51–65. http://doi.org/10.1093/dnares/dsr041

RAO R V., HODGKIN, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources, Plant Cell, *Tissue and Organ Culture*, **68**: 1 - 19, [cit. 2018-03-04]. DOI: 10.1023/A:1013359015812. ISSN 01676857.

REDDY PRADEEP M., N. SARLA, SIDDIQ E. A. (2002). Inter simple semence repeat (ISSR) polymorphism and its applecation in plant breeding. *Euphytica*. 2002. **128**(1), 9-17 [cit. 2018-03-02]. DOI: 10.1023/A:1020691618797.

SHAHIDI, F. (1990). Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology. *Springer*, 1991, ISBN 0442002955.

Shimadzu*: Excellence in Science* [online]. Japan, 2004 [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: https://www.shimadzu.com/an/lifescience/electrophoresis/mce/multina.html

SCHMIDT R., BANCROFT I. (2011) Genetics and genomics of the Brassicaceae. Plant genetics and genomics: crops and models. *Springer*, New York, ISBN 978 – 1 – 4419 – 7118 - 0

SNOWDON R. J., FRIEDT W. (2008). Molecular markers in Brassica oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding* 123(1):1 - 8 DOI: 10.1111/j.1439-0523.2003.00968.x

SOFALIAN O.,CHAPARZADEH N., JAVANMARD A., HEJAZI M. (2008). Study the Genetic Diversity of Wheat Landraces from Northwest of Iran Based on ISSR Molecular Markers. ISSN: *OnlineAWB*. 10. 1560-8530.

ŠTRANC P., ŠTRANC J., PROCHÁZKA P., ŠTRANC D. (2016). *Agromanual.cz* [online]. 25.09.2016 [cit. 2018-03-09]. Dostupné z: https://www.agromanual.cz/cz/clanky/sklizen-a-skladovani/sklizen-1/vyhled-produkce-sojovych-bobu-pro-rok-2016

ŠVACHULA V., VACH M., BEČKA D., ŠIMKA J. (2011). Prosperující olejniny 2011. Praha: ČZU v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, s. 2. ISBN 978-80-213-2218-9.

VAŠÁK, J. (2000). Řepka. Praha: Agrospoj, *Semafor*. ISBN 8023942360.

VIGNAL A., D. MILAN, M. SANCRISTOBAL, EGGEN A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics.*Genetics Selection Evolution,BioMed Central,* **34**(3) DOI: 10.1051/gse:2002009. ISBN 10.1051/gse:2002009

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., Van de LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414.

ZEHNÁLEK P., HOLUBÁŘ J., MEZLÍK T. (2008). Seznam doporučenách odrůd řepka olejka 2008. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno. Brno, ISBN 978-80-7401-002-6.

ZIETKIEWICS E., RAFALSKI A., LABUDA D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase Chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.