

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní obor:

Zemědělské biotechnologie

Studijní program:

Biotechnologie

Katedra:

Speciální produkce rostlinné

Téma práce

**Molekulární markery jako nástroj pro hodnocení
genetických zdrojů řepky a selekci
autoinkompatibilních rostlin**

Autor:

Ing. Eva Jozová

Školitel:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

2017

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra speciální produkce rostlinné

Anotace

Tato práce je zaměřena na využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky. Využití molekulárních markerů ve šlechtění rostlin zahrnuje v současné době řadu aplikací a je již poměrně široké. Práce se zabývá dvěma okruhy: a/ hodnocením genetické diverzity genetických zdrojů používaných v rámci českého šlechtění, b/ využití molekulárních markerů pro selekci rostlin nesoucí funkční S alely. Genetické zdroje řepky byly charakterizovány pomocí standardního fenotypového hodnocení a jejich příbuznost byla odvozována z jejich „rodokmenu“. Použití molekulárních markerů pro hodnocení genetické diverzity je novým přístupem využívajícím techniky molekulárního markerování. V rámci této studie bylo cílem otestovat využití molekulárních markerů pro hodnocení genetické diverzity šlechtitelských materiálů a genetických zdrojů pro šlechtění a vybrat nejvhodnější marker, který by byl využit pro rutinní hodnocení genetických zdrojů. Druhým okruhem pak bylo využití molekulárních markerů jako selekčních nástrojů s cílem vyhledat rostliny nesoucí funkční S alely a vyloučit tak v rané fázi ontogenetického vývoje ty rostliny, které nejsou vhodné pro další šlechtění. Molekulární markery byly zaměřeny na hodnocení S-locusu a genů spojených s projevem autoinkompatibility (SRK, SCR, SLG).

Tyto výsledky jsou v praxi využitelné a šlechtitelům poskytují významné podklady pro další šlechtitelskou činnost.

Grantová podpora

Tato práce byla vytvořena díky podpoře projektů NAZV QI111A075, NAZV QJ1510172, FRVŠ 0466/2013, GAJU 064/2010/Z, GAJU 063/2013/Z, GAJU 120/2016/Z a CZ.1.07/2.3.00/30.0006.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své disertační práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za důvěru a poskytnutou příležitost. Další díky patří kolegům z Katedry speciální produkce rostlinné a šlechtitelům za spolupráci a za poskytnutý materiál. Největší dík pak patří mé rodině, která mě podporovala a měla se mnou trpělivost.

Prohlašuji, že jsem práci zpracovala samostatně a všechny použité literární zdroje uvádím v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:

.....

Summary

Today oilseed rape is the most important sources of vegetable oil in Europe and the second most important oilseed crop in the world after soyabean. However, breeding of oilseed rape has evoked a strong bottleneck selection towards double-low (00, canola) seed quality with zero erucid acid and low seed glucosinolate content. Knowledge of genetic diversity in the primary gene pool of crop plants is very important from a plant breeding and genetic point of view. Intensive breeding provides on the one hand the production of elite genotypes and a wide range of modern varieties, but on the other hand, narrows the genetic background, which complicates the identifications of individual genotypes. These factors further increase pressure on the need for reliable tools to identify individual genotypes/varieties. One of these tools is the use of molecular markers, which in comparison with morphological characteristics, have high predictive value.

Among the variety to be assessed were included in Czech and foreign varieties of contemporary breeding and older varieties from different geographical regions, CMS fertility restorer plants with altered parameters concerning the quality, or plants with different flower color. Seeds of all *B. napus* genotypes were obtained from Crop Research Institute and from three Plant Breeding station. We used three molecular markers: SSRs, ISSRs and AFLP. The aim of this study was to examine the genetic diversity among the selected accessions of winter oilseed rape by molecular markers. Comprehensive examination of the characteristics of this diversity at a molecular level subsequently provides a set of the most diverse genotypes for use in line and hybrid breeding programmes. Furthermore, this investigation could also provide a direct comparison of three molecular marker systems for the assessment of oilseed rape genetic diversity.

Microstetellites, AFLP and ISSR generated bands, which were 100% polymorphic. These three molecular markers systems used in this thesis differed also in the extent of detection diversity. Molecular data were analysed using a digital image analysis and fingerprint patterns from each of the all marker type were transformed into a binary character matrix with 1 or 0. Clustar analysis and PCO analysis were calculated using MVSP 3.1.

The second aim of this thesis was to improve molecular tools for selection of SI/SC plants in early development stages and use this approach based on application of molecular selection in hybrid breeding of oil seed rape.

Self-incompatibility (SI) is defined as the inability to produce zygotes after self-pollination in a fertile hermaphrodite plant, which has stamens and pistils in the same flower. This structural organization of the hermaphrodite flower increases the risk of self-pollination, leading to low genetic diversity. To avoid this problem plants have established several pollination systems, among which the most elegant system is severely SI. In most self-incompatible plant species, recognition of self-pollen is controlled by a single locus, termed the *S*-locus. In *Brassica*, genetic dissection of the *S*-locus has revealed the presence of three highly-polymorphic genes: *S*-receptor kinase (*SRK*), *S*-locus protein 11 (*SP11*) also known as *S*-locus cysteine-rich protein (*SCR*) and *S*-locus glycoprotein (*SLG*). *SRK* encodes a membrane-spanning serine/threonine kinase that determines the *S*-haplotype specificity of stigma. *SP11* encodes a small cysteine-rich protein that determines the *S*-haplotype specificity of pollen. *SLG* encodes a secreted form of stigma protein similar to the extracellular domain of *SRK*.

We studied three genes for their structure, function, role in SI reaction and dominance relationship, having effect of self-incompatibility expression in plant phenotype with the aim to find effective molecular markers for selection of SI plants to accelerate hybrid breeding process. Molecular markers based on analysis of *SLG* I, *SLG* II, *SCR* I and *SRK* I can be successfully used for selection of SI plants and undesirable SC plants are eliminated at early ontogenetic stage from breeding population. Additionally comparative analysis of all of these molecular markers for individual genes can achieve successful selection of functional carriers of recessive *S* alleles during breeding programmes.

Obsah

Anotace	iii
Grantová podpora.....	iii
Summary	v
Obsah	vii
Úvod.....	ix
Cíle práce a hypotézy	xi
Literární přehled	12
1. Biologie řepky	12
1.1 Taxonomická klasifikace řepky	14
1.2 Genetický původ řepky	16
1.3 Pěstování řepky	17
1.4 Šlechtění řepky ve světě.....	18
1.5 Šlechtění řepky v ČR.....	19
1.6 Popis odrůd	21
1.6.1 Typy odrůd u řepky	21
2. Genetická diverzita rostlin.....	24
2.1 Genetická diverzita u řepky.....	25
2.2 Použití molekulárních markerů ve šlechtění řepky.....	26
2.2.1 SSR.....	27
2.2.2 ISSR.....	28
2.2.3 AFLP.....	29
2.3 Hodnocení molekulárních markerů	29
3. Systém Al/AK	32
3.1 Systém Al/AK u rostlin.....	32
3.2 Systém Al/AK u řepky olejky	34
3.3 Způsoby kontroly Al/AK	35
3.4 S-lokus	36
3.4.1 Geny spojené s Al/AK.....	37
3.5 Využití Al/AK v hybridním šlechtění řepky.....	42
3.6 Molekulární markery využívané při hodnocení Al/AK	43
4 Komentář k publikacím.....	45

5	Publikace č.1	50
6	Publikace č.2	61
7	Publikace č.3	66
8	Závěr.....	77
9	Použitá literatura	78
10	Publikace a metodiky	92
	Publikace impaktové.....	92
	Publikace recenzované	92
	Publikace ve sborníku	93
	Metodiky.....	94

Úvod

Řepka (brukev řepka olejka, *Brassica napus* L.) patří mezi nejvýznamnější olejninu a v současné době se ve světovém měřítku řadí na druhé místo hned za sóju. V Evropě je z hlediska výměry dokonce nejvýznamnější olejninou. V České republice je po pšenici nejpěstovanější plodinou, z olejin je řepka hlavní pěstovanou plodinou s 95 % (procentním) podílem z celkové osevní plochy olejin. Díky vysoké intenzitě pěstování patří Česká republika mezi pět největších pěstitelů řepky v EU. V roce 2013 došlo poprvé za 10 let k poklesu osevních ploch řepky z 418 tis. ha na 385 tis. ha. Oproti předchozímu roku došlo i ke snížení výnosu z 3,98 t/ha na 3,40 t/ha, přesto i tak patří k majoritním plodinám pěstovaných v České republice. V roce 2015 byla plocha 366 179 hektarů s průměrným výnosem 3,53 t/ha, v roce 2016 byl výnos 3,46 t/ha na ploše téměř shodné.

Ekonomicky významným druhem se řepka stala zhruba před 40-ti lety, kdy v důsledku šlechtění došlo ke snížení nutričně nežádoucích mastných kyselin v oleji a ke zvýšení výnosů. Hlavními šlechtitelskými úspěchy bylo snížení množství kyseliny erukové v semenech pro lidskou výživu a snížení obsahu alifatických glukosinolátů v pokrutinách pro lepší stravitelnost při krmení hospodářských zvířat. V dnešní době je řepka využívána hlavně jako potravinářská surovina pro lidskou výživu, kdy složení mastných kyselin v mnohém předčí kvalitu olivového oleje, extrahované šroty nebo pokrutiny jsou významnou součástí krmných směsí. Biomasa je vyžívána jako zelené krmení či hnojení a začíná se využívat v bioenergetice, řepková bílkovina je významným zdrojem bílkoviny pro lidskou výživu. Další oblastí využití řepkového oleje je chemický průmysl a jako zdroj obnovitelné energie neboli tzv. bionafta.

Počátky šlechtění řepky v Československu se datují do období první republiky. Řepka nebyla v té době tolik významnou plodinou a byla pěstována na ploše cca 3000 ha, přičemž pěstební plochy měly spíše klesající tendenci. Zájem o řepku byl podnícen potížemi zemědělců při malém odbytu cukrové řepy v důsledku hospodářské krize ve třicátých letech. V té době byla řepka využívána jako vhodná plodina v osevních postupech.

Novodobou historii v českém šlechtění lze zaznamenat se vznikem sdružení „Česká řepka“. Toto sdružení vzniklo v roce 1997 s cílem podpořit šlechtění domácích odrůd řepky olejné, založené na nejnovějších poznatcích vědy a výzkumu, které spojuje

výzkumnou činnost se šlechtěním využitelném v praxi. Iniciací, respektive nutností vzniku tohoto sdružení byla neschopnost konkurence malých českých šlechtitelských firem vůči velkým šlechtitelským firmám v zahraničí. V rámci tohoto sdružení byly vyšlechtěné odrůdy např. Aplaus, Opus, Oksana, Benefit Cortes, Rescator, Orex, Orava. Mezi spolupracovníky tohoto sdružení patří také Zemědělská fakulta JU, které má na těchto úspěších také svůj podíl.

V důsledku zaměření selekčního procesu pouze na hospodářsky nejdůležitější parametry došlo k zúžení genetického základu odrůd řepky a tím pádem klesla míra genetické diverzity. Díky vysokému a rychlému nárůstu počtu odrůd řepky, klesla i schopnost jejich identifikace pouze na základě morfologických znaků. K výraznému posunu došlo s nástupem molekulárních markerů, které detekovaly DNA polymorfismus a prokázaly tak vysokou vypovídací schopnost a lepší porozumění genetické struktuře rodičovských komponent vhodných pro produkci F₁ hybridů. Ve srovnání s morfologickými znaky mají molekulární markery mnoho výhod a jsou úspěšně používány nejen při uznávacím řízení, určování pravosti odrůd a kontrole odrůdové čistoty hybridních odrůd, ale i při detekci transgenů. Markerovací systémy se odlišují v obsahu informací, počtu výsledných polymorfismů, stupni automatizace, pracnosti a výši finančních nákladů.

U řepky a dalších brukvovitých plodin jsou v současné době využívány zejména systémy založené na technice PCR, jako např. PCR-RFLP, SSR, AFLP, ISSR.

Cíle práce a hypotézy

Tato práce byla zaměřena na dva hlavní *cíle*:

- 1) Zavedení technik molekulárních DNA markerů do oblasti popisu a charakterizace genetických zdrojů řepky.

Díličními cíli pak bylo posouzení vhodnosti různých markerovacích systémů se zaměřením na jejich stabilitu, rozlišovací a vypovídací schopnosti a výběr vhodné techniky separace.

- 2) Vývoj nových molekulárních markerů pro selekci / identifikaci rostlin řepky nesoucích funkční recesivní AI alely.

Cílem bylo detekovat geny S-lokusu a vyvinout vhodné markery pro identifikaci funkčních / nefunkčních S alel a pomocí těchto markerů ověřit spolehlivost selekce AI rostlin.

Hypotézy:

- molekulární markery mají dostatečnou rozlišovací schopnost a jejich pomocí je možné identifikovat a rozlišit jednotlivé genotypy v souboru genetických zdrojů řepky
- analýza molekulárních markerů poskytuje stabilní, opakovatelné a reprodukovatelné spektrum markerů
- v českém novošlechtění dochází k zužování genetické diverzity
- pomocí molekulárních markerů lze hodnotit úroveň genetické diverzity genetických zdrojů řepky
- autoinkompatibilní rostliny je možné detekovat pomocí molekulárních markerů v raném ontogenetickém vývoji s dostatečnou přesností a spolehlivostí

Literární přehled

Literární přehled je zaměřen na tři hlavní témata, kterých se týká disertační práce: na biologickou a šlechtitelskou charakteristiku řepky, dále na problematiku genetické diverzity (genetických zdrojů) řepky a molekulárních markerů. Poslední část je zaměřena na popis mechanismu autoinkompatibility u řepky a metody jejího hodnocení.

1. Biologie řepky

Řepka olejka je jednoletá 50-220 cm vysoká samosprašná bylina s podílem cizosprašení 7-70%. Kořen je silný, kulovitý. Díky stavbě kořenového systému, který je z 87% rozložen v ornici, je rostlina zimuvzdornější než jiné brukvovité rostliny. Je odolnější proti suchu, porost a výnosové parametry jsou stabilní (Vašák et al., 2000).

Listy jsou šedozeleně zbarvené, lodyha je přímá, větvená. Na počátku vegetace se tvoří orgány jako kořenový systém a listová růžice a dochází ke shromažďování asimilátů. Shromážděné zásobní látky následně slouží pro tvorbu generativních orgánů, jako jsou květenství, květ, plod a semena. Tvorba generativních orgánů je podmíněna procesem jarovizace a fotoperiodickou indukcí. Jednotlivé anatomické a morfologické struktury jsou specifikovány pomocí fenologických fází, které jsou vhodnými nástroji pro technologie pěstování, ve šlechtění nebo ochraně rostlin a výzkumu (Hejný a Slavík, 2003).

Květenstvím je hrozen. Květ je stavěn podle čísla 4. Obvykle má jasně žlutou barvu. Barva květu je však podmíněna geneticky a v rámci genových zdrojů řepky může docházet k výrazným rozdílům. Může se tedy vyskytovat ve světle žluté či bílé barvě, ale v současné době i oranžová či krémová¹. Kvete v průběhu května, doba květu je asi 20-25 dní. Plodem je dvouřadá šešule se dvěma chlopněmi a blanitou překážkou dlouhá 5-6 cm obsahující asi 15 až 20 drobných černých semen. Semena jsou kulatá červenohnědá až modrošedá, některé odrůdy mohou být i žlutosemenné (Vašák et al., 2000).

¹ Informace poskytnuta na základě ústního sdělení šlechtitelů (Selgen, VÚOL)

V květu je 6 tyčinek, 4 jsou přibližně ve výšce pestíku, 2 tyčinky s krátkými nitkami jsou od blizny částečně odsunuté. Čtyři tyčinky s delšími nitkami jsou obráceny k blizně tak, aby docházelo k opylení vlastním pylem (Fábry et al., 1992).

Řepka se pěstuje ve dvou formách – jako ozimá a jarní, tzv. Canola. V České republice, stejně tak jako v západní a střední Evropě, se pěstuje téměř výhradně ozimá forma řepky. Jarní řepka je pak významnou plodinou v jihovýchodní Asii, ale také severnějších a drsnějších oblastech Kanady, Švédska, Finska, Ruska, na Ukrajině a také ve středoasijských republikách. V Číně se kromě jarní řepky pěstují i tzv. „semi-winter“ odrůdy. Termín setí ozimu je v koncem srpna, sklizeň pak probíhá v průběhu července. Semena se lisují na olej, vylisovaná semena se používají jako krmivo (Friedt et al., 2007).

Hlavními výnosovými prvky řepky je hmotnost 1000 semen, která by se měla pohybovat v rozmezí 3,75 - 6,5 g, počet šesulí na 1 m² a počet šesulí na jednu rostlinu. Jakost a množství oleje významnou měrou ovlivňují podmínky během vegetace. V případě nízkých teplot a zvýšené vlhkosti mají semena vyšší olejnatost a nízké či vysoké teploty v průběhu dozrávání mají vliv na změnu mastných kyselin v oleji. Zastoupení mastných kyselin v oleji je však i výrazně ovlivněno odrůdovou variabilitou (Baranyk et al., 2007).



Brassica napus L. var. *napus*

Franz Eugen Köhler, *Köhler's Medizinal-Pflanzen*, 1897

Obrázek 1 Charakteristická stavba řepky, jejího květenství a plodů

1.1 Taxonomická klasifikace řepky

Řád *Brassicales* zahrnuje 46 čeledí (Warwick et al., 2006). Významná čeleď tohoto řádu je čeleď *Brasiceae*, která zahrnuje více než 4000 druhů a obsahuje ekonomicky významné plodiny, jako jsou olejniny, zeleniny, ale např. i koření (Paterson et al., 2001). Jedním z nejvýznamnějších celosvětově rozšířeným druhem tohoto řádu je druh brukev řepka olejka *Brassica napus* L., který se dále dělí na poddruhy *Brassica napus* subsp. *napobrassica* (L.) Hanelt – brukev řepka tuřín a *Brassica napus* L. subsp. *napus* – brukev řepka olejka. Doposud u řepky nebyl nalezen

planý předek, jde o fylogeneticky velmi mladý druh vzniklý na základě spontánní hybridizace mezi *B. oleracea* a *B. rapa*. První záznamy o tomto druhu se v různých publikacích velmi liší. Allender a King (2010) a Zamani-Nour et al. (2012) uvádějí vznik druhu před 500 lety, naopak Cheung et al. (2009) se odkazují na výsledky fylogenetických analýz a uvádějí, že ke zkřížení těchto dvou druhů došlo již před méně než 10 000 lety. Dalším pohledem pak může být myšlenka Salaminioho et al. (2002), který uvádí, že druhy byly prokříženy před zhruba 12 000 let, kdy přešla skupina lidí z lovců na sběrače a tím v podstatě vznikla éra domestikace a záměrného pěstování rostlin, které dnes tvoří základ pro výživu lidí.

Původní výskyt druhu *Brassica napus* lze dohledat v jižní Evropě a Středozeří, kde mají výrazný rozsah rodičovské taxony (Song a Osborne, 1992).

Druh *Brassica napus* jako první popsal v roce 1753 Carl Linnaeus. Jím dalším popsaným druhem z rodu *Brassica* byl druh *Brassica rapa*, tento druh byl ale jinými autory uváděn pod jménem *B. campestris*. Takto pojmenovaný druh zahrnoval i taxony, které byly později rozděleny na poddruhy *B. rapa* ssp. *rapa*, spp. *oleifera* a spp. *perviridis* a na druhy *Brassica pekinensis* a *Brassica chinensis*. Metzger v roce 1833, kdy podrobně popisoval rod *Brassica*, došel k závěru, že druhy *Brassica rapa* a *Brassica campestris* by měly být spojeny pod jeden druh, a tak tyto nazval jednotně *Brassica rapa*. Pozdější studie potvrdily tuto teorii na základně shodného počtu chromozomů a při křížení hybridních potomků (Luijten a Jong, 2010).

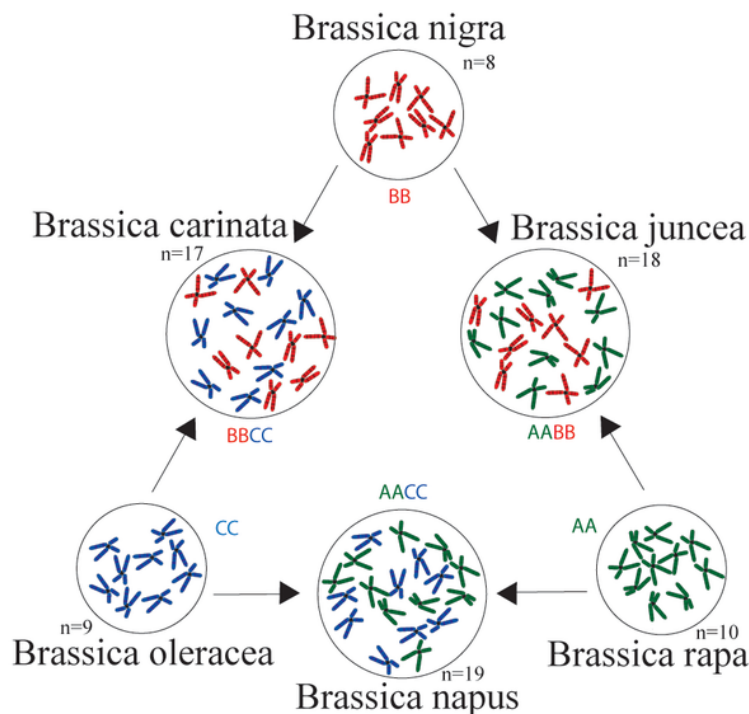
Zařazení druhu

říše	<i>Plantae</i> – rostliny
oddělení	<i>Magnoliophyta</i> – rostliny krytosemenné
třída	<i>Rosopsida</i> – vyšší dvouděložné rostliny
řád	<i>Brassicales</i> – brukvotvaré
čeleď	<i>Brassicaceae</i> – brukvovité
rod	<i>Brassica</i> – brukev
druh	<i>Brassica napus</i> – brukev řepka
poddruh	<i>Brassica napus</i> subsp. <i>napus</i> – brukev řepka olejka

(Hejtný a Slavík, 2003)

1.2 Genetický původ řepky

Řepka je přirozený autoallotetraploid vzniklý spontánní hybridizací a polyploidizací. Základní dogma vzniku řepky (*B. napus*) jako první popsal v roce 1935 korejský botanik Woo Jang-choon, ve vědeckém světě známý pod jménem U. Ten ve svých pracích navázal na hybridizační experimenty Morinagy (Morinaga, 1929 a,b,c; 1933; 1934) a potvrdil hybridní původ řepky. Původ řepky je uveden na obr. 2, který popisuje křížení mezi druhy – *Brassica rapa* – brukev řepák ($2n=20$, genom AA), *Brassica nigra* – brukev černá (černohořčice) ($2n=16$, genom BB) a *Brassica oleracea* – brukev zelná ($2n=18$, genom CC), díky němuž vznikly tři amfidiploidní druhy vždy vzniklé křížením dvou z těchto druhů. Mezi nejvýznamnější z nich patří *Brassica napus* (genom AACC, $2n=38$), který vznikl z náhodného křížení mezi druhy *Brassica rapa* – brukev řepák (AA, $2n=20$) a *Brassica oleracea* – brukev zelná (CC, $2n=18$). Dalšími dvěma druhy jsou *Brassica juncea* - brukev sítinovitá ($2n=36$, genom AABB) vzniklý křížením *Brassica rapa* a *Brassica nigra* a druh *Brassica carinata* – hořčice habešská ($2n=34$, genom BBCC) vzniklý křížením *Brassica nigra* a *Brassica oleracea*.



Obrázek 2 Základní schéma vzniku druhu *Brassica napus* dle U (1935)

1.3 Pěstování řepky

Řepka olejka (*B. napus*) je jednou z nejstarších olejnin. Ve větším rozsahu se pěstuje od 19. stol. Původní uplatnění řepky bylo ve středověku zejména pro výrobu olejů na svícení a mazání, či pro účely mydlářství a pouze v minimální míře jako potravina (Baranyk et al., 2007). V dnešní době je řepka využívána hlavně jako potravinářská surovina pro lidskou výživu, kdy složení mastných kyselin v mnohém předčí kvalitu olivového oleje (Przybylski, 2011). Extrahované šroty nebo pokrutiny jsou významnou součástí krmných směsí, biomasa je vyžívána jako zelené krmení či hnojení, řepková bílkovina je významným zdrojem bílkoviny pro lidskou výživu. Další oblastí využití řepkového oleje je chemický průmysl a jako zdroj obnovitelné energie neboli tzv. bionafta. K výraznému nárůstu ploch i produkce řepky došlo po roce 1960, v Evropě po roce 1970 (Bečka et al., 2007). Do té doby byla řepka jako zdroj pro lidskou výživu používána v omezeném množství kvůli vysokému obsahu kyseliny erukové, která je nebezpečná pro srdeční svalovinu. Bylo prokázáno, že po konzumaci stravy bohaté na kyselinu erukovou se u pokusných zvířat projevil zvýšený výskyt myokarditidy, myokardiální fibrózy a docházelo k akumulování lipidů v srdci (FSANZ, 2003). Kvůli vysokému obsahu glukosinolátů, které jsou nestravitelné pro hospodářská zvířata. Dnes je stanoven limit pro kyselinu erukovou max. 2%, ovšem reálné hodnoty se pohybují dokonce v množství 0,3-0,5%. V současné době je řepka celosvětově druhou nejvýznamnější olejninou. Roční produkce je cca 70 mil tun semene (Ash, 2014).

V České republice je po pšenici nejpěstovanější plodinou. Z olejnin je řepka hlavní pěstovanou plodinou s 95 % podílu z celkového množství olejnin. Díky vysoké intenzitě pěstování patří Česká republika mezi pět největších pěstitelů řepky v EU (Trostle, 2010). V roce 2013 došlo poprvé za 10 let k poklesu osevních ploch řepky z 418 tis. ha na 385 tis. ha (www.czso.cz). Tento pokles mohl být způsoben opožděnou sklizní a tudíž řada farmářů nestihla včas zasít pro následující rok, ale i menší poptávkou po řepce a poklesu výkupních cen. Oproti předchozímu roku došlo i ke snížení výnosu z 3,98 t/ha na 3,40 t/ha, v letech následujících se osevni plocha opět zvýšila.

1.4 Šlechtění řepky ve světě

Z hlediska velkého zájmu o pěstování řepky by mělo být šlechtění významným oborem, který by se neměl bránit ani novým metodám a přístupům. Je třeba klást velký důraz nejen na šlechtění na výnos, ale i na odolnost vůči povětrnostním vlivům jako jsou chladuvzdornost, zimuvzdornost či suchovzdornost a odolnost vůči chorobám.

Ekonomicky významným druhem se řepka stala zhruba před 40-ti lety, kdy v důsledku šlechtění došlo ke snížení nutričně nežádoucích mastných kyselin v řepkovém oleji a zvýšení výnosů. Zdrojem znaků kvality a nízkého obsahu kyseliny erukové v oleji byla krmná odrůda Liho, která byla využita jako jeden z rodičovských komponentů při šlechtění. Z tohoto křížení byla v roce 1968 vyšlechtěna kanadská odrůda Oro. Odrůdy se sníženým obsahem kyseliny erukové jsou označovány jako jednonulové odrůdy – typ „0“. Konkrétně odrůda Oro měla obsah kyseliny erukové nižší než 1%, oproti dřívějším 50% (Downey, 1990). Obdobným způsobem byla v roce 1974 uznána odrůda „Tower“, jejíž rodičovským komponentem byla polská odrůda „Bronowski“ s nízkým obsahem glukosinolátů. Odrůda „Tower“ byla vyšlechtěna jak na nízký obsah glukosinolátů, tak i na nízký obsah kyseliny erukové. Tento typ odrůdy byl označen jako dvounulový – typ „00“ (Snowdon et al., 2007).

Další šlechtění na kvalitu bylo zaměřeno na změnu obsahu kyseliny linolenové a olejové. Výsledkem byly dvě nové odrůdy „Splendor“ a „Nexera“ s obsahem 75% kyseliny olejové a s obsahem kyseliny linolenové menší než 3%. Díky tomu získala řepka výbornou oxidační stálost a řepkový olej se stal vhodným i pro smažení. (Snowdon et al., 2007). Dále se současné šlechtění zaměřuje na šlechtění typu odrůd: „LEAR“ (low-erucic, nízký obsah kyseliny erukové), „HEAR“ (high-erucic, vysoký obsah kyseliny erukové), „HOAR“ (high-oleic, vysoký obsah kyseliny olejové), „LLAR“ (low-linolic, nízký obsah kyseliny linoleové) (Pua a Douglas, 2004), „HOLL“ (high oleic low linolenic, vysoký obsah kyseliny olejové a nízký obsah kyseliny linoleové) (Bečka et al., 2007), „HO“ (obsah kyseliny olejové nad 80 %), „stearin“ (obsah kyseliny stearové nad 25%), „EG“ (obsah kyseliny erukové nad 50%), „EEE“ (obsah kyseliny erukové nad 65%), „PHA“ (produkce polyhydroxy mastných kyselin pro výrobu bioplastů) atd. (Koprna, 2015).

Dalším mezníkem ve šlechtění řepky bylo objevení systémů řízeného opylení, jako jsou jaderná samčí sterilita (GMS), cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) a autoinkompatibilita (AI). Díky těmto poznatkům se šlechtitelé zaměřili na vytváření

hybridních odrůd. Ovšem v současné době se nešlechtí pouze odrůdy pro potravinářské využití, některé odrůdy řepky jsou šlechtěny přímo pro využití na bionaftu a pro použití jako průmyslová maziva. Vedle hospodářských znaků je důležité šlechtění na odolnost vůči patogenům (Allender a King, 2010).

1.5 Šlechtění řepky v ČR

Počátky šlechtění řepky v Československu se datují do období první republiky. Řepka nebyla v té době tolik významnou plodinou a její pěstování probíhalo na ploše o velikosti cca 3000 ha, přičemž pěstební plochy měly spíše klesající tendenci (Havel, 1998). Zájem o řepku byl podnícen potížemi zemědělců při malém odbytu cukrové řepy v důsledku hospodářské krize ve třicátých letech, kdy byla využívána jako vhodná plodina v osevních postupech (Frühaufová, 1998).

Za existence Československé republiky nastal rozvoj výzkumu pěstitelské technologie a částečně i šlechtění řepky. Za okupace Československa se na území protektorátu řepka pěstovala v roce 1944 na ploše téměř 38 tis. ha a na území tehdejšího Slovenského štátu kolem 4 tis. ha. Plochy řepky se udržely ve stejném rozsahu i po roce 1945. Dnešní pěstitelské plochy se v posledních letech pohybují okolo 350-400 tis. hektarů s výnosem přesahujícím 3 t/ha. Např. v roce 2015 byla plocha 366 179 hektarů s průměrným výnosem 3,53 t/ha, v roce 2016 byl výnos 3,46 t/ha (APIC-AK, 2017).

V České republice, respektive Československu, sahá historie účelného šlechtění až do období první republiky, kdy výběrem domácích krajových odrůd a odrůd zahraničního původu (Mansholtova, Lembkeho, Lübnická, Janetzki, Esterháza) vznikly ozimé řepky „Třebíčská krajová“ (šlechtitelská stanice ve Stránecké Zhoři, povolena v roce 1941), „Slapská“ (šlechtitelská stanice Slapy u Tábora, povolena 1946) a jarní odrůdy řepky „Česká krajová“ (šlechtitelská stanice Chlumeck nad Cidlinou, povolena 1949) (Baranyk et al., 2007). Tyto odrůdy se udržely v sortimentu nabízených odrůd až do nástupu „bezerukových“ odrůd v 80. letech. Od roku 1960 se prováděly práce v oblasti šlechtění řepky na zlepšení zimovzdornosti rostlin a nepukavosti šesulí - pro tyto účely byl dokonce sestaven prototyp přístroje na stanovení odolnosti šesulí proti pukání (Havel, 1998) a na možném snížení obsahu kyseliny erukové. Na přelomu 60. a 70. let byly prováděny úvodní studie ve směru využití heteroze řepky. Mezi šlechtitelské pokusy patřila i oktoploidizace, $2n=76$. Tyto pokusy nebyly úspěšné a docházelo ke snížení počtu semen na šesuli, celkově o 25-30%. Po roce 1970, kdy se

v Evropě začíná intenzivněji šlechtit, nastupují řepky tzv. „0“ kvality, tedy odrůdy s minimálním obsahem kyseliny erukové (Rod et al., 1982; Bečka et al., 2007). Počínaje rokem 1985 byl zahájen výzkum autoinkompatibility u ozimé řepky. Na přelomu 80. a 90. let došlo k velmi rychlému a komplexnímu přechodu na tyto směry šlechtění řepky: 00 typy, E0 typy (vysoký obsah kyseliny erukové a nízký obsah glukosinolátů), typy se změněnou skladbou mastných kyselin, žlutosemenné typy, linie s nízkým obsahem sinapinu a progoitrinu. První českou povolenou jednonulovou odrůdou byla v roce 1983 Silesia, které měla minimální obsah kyseliny erukové. V roce 1990 byla povolena první 00 odrůda – Sonáta. Šlechtění typu E0 vyústil do povolení nové české odrůdy Oáza, určené pro průmyslové účely (Potměšilová, 2012).

Novodobou historii v českém šlechtění lze zaznamenat se vznikem sdružení „Česká řepka“, které spojuje výzkumnou činnost se šlechtěním využitelném v praxi. Iniciací, respektive nutností vzniku tohoto sdružení byla neschopnost konkurence malých českých šlechtitelských firem vůči velkým šlechtitelským firmám v zahraničí. V rámci tohoto sdružení byly vyšlechtěné odrůdy např. Aplaus, Opus, Oksana, Benefit Cortes, Rescator, Orex, Orava (Zehnálek, 2012; Baranyk et al., 2016).

Členy sdružení „Česká řepka“ jsou: OSEVA PRO s.r.o., SEMPRA PRAHA, a.s., SELGEN, a.s., AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. a Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.vi. Mezi spolupracovníky tohoto sdružení patří také Zemědělská fakulta JU, které má na těchto úspěších také svůj podíl.

Tabulka 1 Stručně úspěchy českého šlechtění podle charakteristik odrůd

Období	Charakteristika odrůd	Využití
Do r. 1975	„EG“ odrůdy s nevyhovující kvalitou – vysoký obsah kyseliny erukové (KE) v oleji a glukosinolátů (GSL) ve šrotu	Malé možnosti využití, olej hlavně pro technické účely
Rok 1975 až 1985	Tzv. „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 až současnost	„00“ odrůdy s minimálním obsahem KE a nízkým obsahem GSL (zprvu do 30 $\mu\text{mol/g}$ semene, od r. 2005 do 18 $\mu\text{mol/g}$ 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 Ogu-INRA)	Stejné použití jako „00“ odrůdy, avšak uplatnění heterozního efektu v podobě vyšších výnosů, obecně lepší odolnost rostlin proti stresům
Od roku 2000	Výkonné liniové i hybridní odrůdy s velmi nízkým	Nárůst osevních ploch, šlechtění odrůd se speciálním složením olejů,

	obsahem GSL, nové trendy – změněná skladba mastných kyselin v oleji, polotrasličí odrůdy, mimo Evropu i žlutosemenné odrůdy, využití GMO technologií atd.	potravinářské účely, MEŘO, pro výrobu bionafty, tolerance k herbicidům, mrazuvzdornost, odolnost k chorobám a škůdcům atd.
Od roku 2004	Výrazný nárůst výnosových schopností nových odrůd	Jak u liniových, tak i u hybridních odrůd byl zaznamenán nárůst výnosových schopností. Původně odhadovaný potenciál sklizně 8t/ha, byl na pokusné stanici v Hněvčevsi překonán, kdy u odrůdy Vectra byl opakovaný výnos cca 10t/ha

(Baranyk et al., 2007; Baranyk et al., 2016)

1.6 Popis odrůd

Původně se pro tvorbu nových odrůd využívalo metody výběru, postupem času se přidávaly metody křížení a oddělené pěstování vybraných jedinců. Typ odrůd je dán způsobem reprodukce dané plodiny. U současných plodin se rozlišuje několik typů odrůd z hlediska jejich genetické struktury a reprodukce, to určuje i způsob šlechtění. Nově vyšlechtěné odrůdy mají většinou nahradit dosavadní registrované odrůdy, které by mohly ovšem sloužit jako jeden z rodičů použitých v novém šlechtění. Obvykle bývá zapotřebí vnést do nové odrůdy geny z více rodičů z důvodu jistějšího úspěchu a zejména pro kombinaci vlastností (Ehrenbergerová, 2014).

V současné době jsou využívány dva způsoby šlechtění řepky – liniové a hybridní (Chloupek, 2007). Současným trendem je vytvářet hybridní odrůdy, ačkoliv liniové odrůdy stále vykazují výnosový vzestup. Hybridní řepka se v České republice pěstuje od roku 1998. Nárůst pěstování je výrazný, např. v roce 2005 to bylo 21% v roce 2013 pak 70% (Volf a Zeman, 2013) a v roce 2016 dokonce již 88% hybridních odrůd na pěstitelských plochách (Baranyk et al., 2016).

1.6.1 Typy odrůd u řepky

Liniové odrůdy

U liniového šlechtění vznikají odrůdy s požadovanými vlastnostmi pro různé pěstitelské oblasti a cíle pěstování. Odrůdy typu linie se šlechtí hlavně u samosprašných

rostlin. Každá linie představuje potomstvo jedné rostliny po opakovaném samoopylení, tzn., že po mnoha generacích vznikají homozygotní čisté linie.

Na začátku šlechtění odrůd typu linií se většinou prokříží dva rodičovské komponenty, které jsou také původem liniové. V F₂ generaci dochází k výběru kmenových matek a následuje mnohaletý výběrový postup, v současné době se odrůdy typu linie přihlašují do zkoušek v generacích F₇ až F₁₀ (Ehrenbergerová, 2014).

Výhodou tohoto typu odrůd je jejich schopnost zachovat si dobré vlastnosti i při přesévání, proto je možné využívat i tzv. farmářského osiva, tj. osiva z vlastní sklizně (Hraška et al., 1989).

Hybridní odrůdy

Na rozdíl od odrůd předchozích farmářského osiva využít nelze. U hybridního osiva je využíváno heterozního efektu v F₁ generaci. Pro vyšlechtění hybridních odrůd je důležité vybrat rodičovské komponenty (dva, tři či čtyři), které mají dobrou kombinační schopnost. Výhodou oproti liniovým odrůdám je dosažení cca 10-15% vyššího výnosu vlivem heteroze, rychlejší počáteční vývoj a vyšší odolnost ke stresům vlivem mohutnější stavby stonku i kořene. Tyto vlastnosti umožňují snížení výsevku a pozdější termín setí (Frauen a Paulmann, 1999). Hybridní odrůdy velmi rychle snižují výnos po přemnožování do druhé a další generace, proto je nutné podmínky pro jejich udržování neustále obnovovat (Hraška et al., 1989).

Jednoduché hybridy bývají nejproduktivnější i nejvyrovnanější a šlechtění je tím pádem i jednodušší. Počet porostů pro produkci komerčního hybridu pěstovaných v prostorové izolaci, se zvyšuje od jednoduchých kříženců pro dvojité hybridy. Čím geneticky vzdálenější se zvolí rodičovské odrůdy, tím je vyšší stupeň heterozygotnosti u hybridu, který tak poskytuje vyšší výnos. Heteroze je tak vyšší u hybridu s vyšší heterozygotností oproti homozygotnějšímu hybridu. V hybridech je možné kombinovat i vyšší rezistenci k chorobám a tak dosáhnout komplexnější rezistence než u linií. U hybridů s homozygotními rodiči považujeme za heterozní převahu výnosu hybridů nad rodiči. Heteroze bývá značně vyšší u cizosprašných druhů, jako je kukuřice, žito, cukrovka a nižší u částečně cizosprašné řepky, ještě nižší u samosprašných druhů jako jsou pšenice a rýže (Ehrenbergerová, 2014).

Výhody hybridních odrůd

- vysoký až velmi vysoký výnos semen, který je dosahován díky heteróznímu efektu
- dobrá zimovzdornost, vysoká tolerance k horku a suchu, jako i nízká citlivost k nepříznivému počasí (dešťové srážky během kvetení) jsou dalšími charakteristickými vlastnostmi, které zvláště v poslední době pěstitelé u hybridů oceňují vzhledem k častým klimatickým extrémům
- více času při výsevu: restaurované hybridní odrůdy jsou v podzimním období velmi vzrůstné a vitální, lépe než liniové odrůdy snášejí setí ke konci agrotechnických lhůt
- hybridní odrůdy jsou zvláště vhodné pro těžší půdy a přechodná stanoviště, bezorebně hospodařící podniky dávají přednost vzrůstným a vitálním odrůdám se silně vyvinutým kořenovým systémem a vysokou tolerancí ke stresu
- restaurované hybridy mají obvykle mohutný raný vývoj s dobrou schopností konkurovat tlaku plevelů. Podzimní hnojení dusíkem nebývá nutné, přesto menší dávka bývá přínosem (Baranyk et al., 2016).

2. Genetická diverzita rostlin

Opakované a záměrné pěstování plodin vedlo ke vzniku krajových odrůd, které se svými vlastnostmi přizpůsobily podmínkám prostředí, ve kterém byly vypěstovány (Friedt et al., 2007). A právě krajové odrůdy představují u většiny plodin první krok ke vzniku nových cíleně šlechtěných odrůd s vylepšenými vlastnostmi, jak z hlediska výživy tak i pěstování (Ferne et al., 2006). Nicméně právě z důvodu výběru jen na určité kvalitativní a kvantitativní parametry (zejména výnos) dochází u některých druhů ke značnému zúžení genetické variability, ztrátě řady cenných genů a vlastností tzv. planého charakteru a v důsledku pěstování těchto moderních odrůd pak k úplnému vymizení krajových odrůd, či primitivních odrůd (Zamir, 2001).

Díky rozvoji moderního šlechtění docházelo ve 20. století ke snižování genetické diverzity a to v důsledku pěstování výnosnějších odrůd, které jsou si často vzájemně příbuzné (Rao a Hodgkin, 2002). Docházelo k pěstování stále menšího počtu odrůd intenzivních, vysoce výnosných a kvalitních odrůd. K tomuto přispívali jak zákazníci, kteří kladli důraz na neměnné hodnoty u jednotlivých odrůd, tak i samotní pěstitelé, kteří preferovali a preferují pěstování výnosnějších odrůd. Avšak bez široké základny pro výběr rodičovských komponent není možné, aby šlechtitelé na tyto vlastnosti dosáhli. V důsledku zúžení genetické základny jsou pak problémy s vyšlechtěním odrůd odolných k biotickým i abiotickým stresům (Friedt et al., 2007). V roce 1992 byla vypracována při OSN „Konvence o biologické diverzitě“, kterou v roce 1994 podepsala i naše republika. Základním principem je zodpovědnost každého státu za vlastní genetické zdroje formou *in situ* (na původních nalezištích) a *ex situ* (většinou pomocí genových bank) (Chloupek, 2007). V roce 2014 to bylo celkově 16 pracovišť, která se podílejí na „Národním programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity“. Centrálně jsou data shromažďována v genové bance VÚRV, v.v.i. Genetické zdroje v ČR zahrnují zhruba 52 tisíc položek, ve kterých je zahrnuto téměř 1200 druhů rostlin. Tento program pro uchování genetických zdrojů byl v ČR zahájen v roce 1993 jako standardní řešení pro zabezpečení práce s genetickými zdroji. V roce 2015 bylo poprvé využito také uchování 800 semenných vzorků ve světové genové bance umístěné na Špicberkách (Jordán, 2015).

Jelikož denně dochází k vymizení asi sta druhů, ztrácejí se tak i druhy, které jsou unikátní jak svým původem, tak třeba i svými vlastnostmi. Proto odborníci a šlechtitelé

požadují ochranu genetické diverzity. Ztráta genetické diverzity se považuje za největší problém ze současných nejzávažnějších ekologických problémů (Ehrlich a Ehrlich, 1983). Bohužel genetickou diverzitu nelze rozšířit tak, aby došlo k navrácení původního stavu, proto bylo potřeba vyvinout jiné způsoby uchování. Může se jednat o uchování na úrovni genových rezerv, populací, individuí, genomu, lokusu nebo na úrovni sekvence bazí DNA (Kresovich a McFerson, 1992). Jak se ukázalo, tak největší význam pro genetickou variabilitu má geografický původ dané populace (Chloupek, 2007).

2.1 Genetická diverzita u řepky

Jak už bylo výše řečeno řepka, stejně jako pšenice, vznikla mezidruhovým křížením a následnou polyploidizací. Ovšem ve srovnání s pšenicí či ostatními hospodářsky významnými druhy je řepka velmi mladý druh, který pravděpodobně vznikl jen před několika stoletími (Alder a King, 2010; Zamari-Nour et al., 2012). Je pravděpodobné, že prokřížení druhů *B. rapa* a *B. oleracea* vzniklo nejspíš při obchodních cestách z východní Asie do oblasti středomoří a na východ. Ovšem omezený zeměpisný rozsah a intenzivní šlechtění vedlo k zúžení genetického základu (Annisa et al., 2011; Girke et al. 2012). Genofond elitních odrůd řepky byl zúžen zejména zaměřením na nulový obsah kyseliny erukové a nízký obsah glukosinolátů, což vzniklo v důsledku požadavků na výživu. V posledních desetiletích je na řepku pohlíženo také jako na zdroj výživy pro hospodářská zvířata. Právě proto je nutné upravit obsah glukosinolátů a kyseliny erukové. Pokud by se do šlechtění zapojily původní odrůdy, mohlo by dojít například k lepší odolnosti vůči patogenům, kteří začínají být rezistentní vůči používaným pesticidům (Hasan et al., 2006). Výzkum genotypu rodu *Brassica* vnesl nové a efektivní hodnocení pro genetickou diverzitu (Harper et al., 2012).

K opětovnému zvýšení genetické diverzity by se daly využít genotypy vytvořené pomocí vzdálené hybridizace (Nieman et al., 2012) nebo pomocí tzv. resyntetizované řepky vytvořené z dihaploidních předků – řepice (*Brassica rapa*) a brukve (*Brassica oleracea*), za pomoci biotechnologických metod (Wen et al., 2008). Pomocí těchto postupů lze do genofondu řepky vnést perspektivní znaky a vlastnosti, které mohou zvýšit biologický a produkční potenciál stávajících genotypů jako např. odolnost k suchu, chorobám a škůdcům, autoinkompatibilitu, pylovou sterilitu, obnovu fertility,

žlutosemennost, specifické zastoupení mastných kyselin, glukosinolátů, mohutnější kořenový systém apod. (Rai et al., 2007).

2.2 Použití molekulárních markerů ve šlechtění řepky

Tradiční morfologická, fenologická a agronomická data byla používána jako hlavní kritéria při šlechtění rostlin. V důsledku zaměření selekčního procesu pouze na hospodářsky nejdůležitější parametry došlo k zúžení genetického základu odrůd řepky a tím pádem klesla míra genetické diverzity (Soltis et al., 1998). Díky vysokému a rychlému nárůstu počtu odrůd řepky, klesla i schopnost jejich identifikace pouze na základě morfologických znaků. S tímto problémem se začali potýkat také inspektoři ÚKZÚZ při registračních zkouškách a DUS (Distinctness Uniformity Stability) testech, kdy se pro určení odrůd využívalo omezeného počtu morfologických znaků (UPOV, 2002). K výraznému posunu došlo s nástupem molekulárních markerů, které detekovali DNA polymorfismus a jenž prokázaly vysokou vypovídací schopnost a lepší porozumění genetické struktury rodičovských komponent vhodných pro produkci F₁ hybridů (O'Neill et al., 2003; Yu et al., 2007). Ve srovnání s morfologickými znaky mají molekulární markery celou řadu výhod a jsou úspěšně používány při určování pravosti odrůd, kontrole odrůdové čistoty hybridních odrůd, ale i detekci transgenů. Jsou také vhodným pomocníkem k porozumění genetického toku, i stupně prokřížení a hodnocení jednotlivých odrůd (Rao a Hodgkin, 2002).

Jedním z prvních průkopníků pro zavedení těchto metod byl např. Song et al. (1990), Thormann et al. (1994), Uzunova et al. (1995) atd., kteří použili pro hodnocení genetické vzdálenosti mezi brukvovitými metodou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a RAPD markery (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Další, kdo začal využívat pomoci molekulárních markerů ve šlechtění řepky, byl Halldén (1994), Diers (1994) a další. Ačkoliv tyto metody jsou vytlačovány stále novějšími markery, i tak mají pro tyto účely stále své uplatnění, např. Poyaraz (2016). Tyto metody mohou mít výhodu ve své nenáročnosti na přístrojové vybavení a i oproti jiným metodám celkem nízké provozní náklady na dnes již základní vybavení laboratoře.

Další poměrně hojně využívanou metodou je AFLP. Pomocí této metody např. Lombard et al. (2000) dokázali mezi sebou odlišit 83 různých genotypů řepky na jarní a ozimou. V současné době tuto metodu využil např. El-Esawi et al. (2016). Za nejčastěji využívanou metodu při hodnocení genetické diverzity lze jednoznačně označit metodu SSR, kterou pro účely druhu *Brassica* použili Plieske and Struss (2001), kteří pomocí

61 primerových párů detekovali 198 polymorfismů, na jejichž základě byli schopni odlišit 32 odrůd druhu *Brassica napus*.

Markerovací systémy se odlišují v obsahu informací, počtu následných polymorfismů, stupni automatizace, pracnosti a výši finančních nákladů (Čurn a Žaludová, 2007). Nejčastěji používanými markery pro tyto účely jsou např. SSR, ISSR, AFLP, RFLP, RAPD, SNP atd. Markery RFLP a RAPD jsou již méně využívané metody.

2.2.1 SSR

Simple sequence repeats (SSR) markery, známé jako mikrosatelity jsou krátké tandemové motivy, obsahující 1-6 páru bází. Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50-ti kopiích. Některé studie prokázaly, že mikrosatelity mohou být nalezeny každých 52 kb (Ashkenazi et al., 2001). Mikrosatelity lze nalézt jak v prokaryotických, tak i eukaryotických organismech (Zane et al., 2002). Mikrosatelity se také ukázaly jako mimořádně cenné při konstrukci map eukaryotických chromozomů o vysoké hustotě (Snustad a Simmons, 2009).

Mohou být nalezeny kdekoli v genomu jak v kódujícím, tak i nekódujícím úseku (Varshney et al., 2005) Jsou to kodominantní markery založené na vysoké úrovni polymorfismu (Lydiat a Sharpe, 2003). Mikrosatelity se řídí jednoduchou mendelistickou dědičností, proto mohou být při použití pro velmi příbuzné druhy konzervativní, ovšem pro odlišení odrůd se ukázaly jako vhodný pomocník (Pilinsky et al., 2011). Počet opakování jednotky v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu. Délku alely lze zjistit po elektroforetické/fragmentační analýze PCR produktů daného lokusu díky použití primerů specifických pro příslušný lokus. Systémy využívající mikrosatelity u řepky ozimé jsou vhodné z důvodu řady známých specifických SSR primerů pro druhy rodu *Brassica* (Čurn et al., 2012). Pro analýzu genetických zdrojů řepky se používají i tzv. cross-species mikrosatelitové primery, které mohou být odvozeny např. pro druh *Arabidopsis* nga 129-1, nga 139-1 (Bell a Ecker, 1994). Další výzkumy potvrdily, že tyto dva primerové páry amplifikovaly mikrosatelity též u *Brassica napus* (Westman a Kresovich, 1998). Z důvodu uváděného vysokého stupně polymorfismu byl pro analýzu odrůd, zvláště pak DH linií a později též AI linií, testován SSR primer Bn9a (Kresovich et al., 1995).

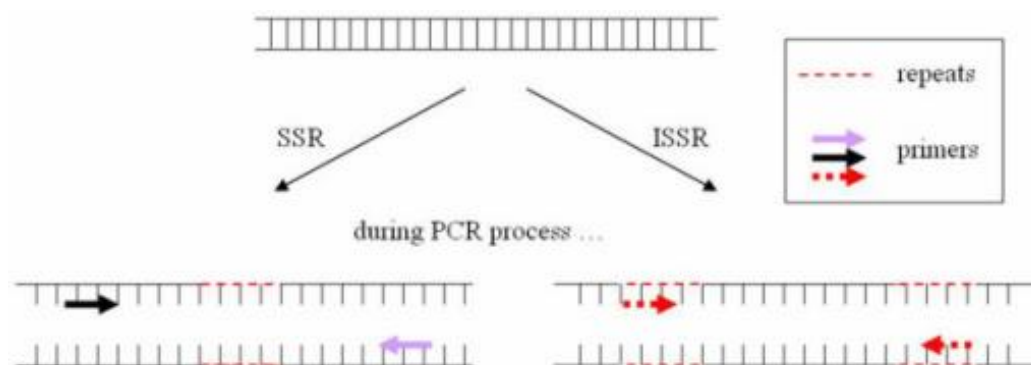
Výhodou využití tohoto markeru je poměrně jednoduché technické zpracování a opakovatelnost. Nevýhodou pak můžou být vysoké náklady na fragmentační analýzu a syntézu značených primerů.

2.2.2 ISSR

Technika ISSR neboli Inter Simple Sequence Repats je modifikací techniky SSR markerů (Kantety et al., 1994). První zmínky o této technice se objevily na počátku 90-tých let v několika vědeckých týmech (Gupta et al., 1994; Wu et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994). Tato technika je založena na použití PCR amplifikace s náhodně ukotveným mikrosatelitovým motivem. Na rozdíl od SSR není při ISSR nutná žádná předchozí znalost sekvence či struktury studovaného genomu. Díky těmto charakteristikám je tato metod též známa pod zkratkou RAM - Random Amplified Microsatellites (Abdelmigid, 2012; Ng a Tang, 2015)

ISSR jsou vhodným nástrojem při hodnocení např. fylogenetických vztahů nebo pro využití jak hodnocení diverzity na mezidruhové úrovni, tak i pro hodnocení genetické diverzity na úrovni odrůdové a proto může být tato technika vhodným pomocníkem při šlechtění nejen řepky, ale i jiných zemědělských plodin (Kantety et al., 1995).

Tato metoda je vhodná díky vysokému polymorfismu, reprodukovatelnosti výsledků a finanční nenáročnosti, proto je tato technika stále využívána (Havličková et al., 2014; Poyraz, 2016).



Yip et al., 2007

Obrázek 3 Porovnání ISSR a SSR primerů v průběhu PCR. Zatímco SSR metoda je založena na amplifikaci konkrétního úseku za využití forward a reverse primeru, u metody ISSR je využit jeden primer, který je založen na repetici mezi dvěma úseky.

2.2.3 AFLP

Metodu AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) jako první v roce 1995 popsal Vos (Vos et al., 1995). Tato metoda díky svým vlastnostem „nahradila“ metody RFLP a RAPD (El-Esawi et al., 2016). AFLP je založena na selektivní amplifikaci restrikčních fragmentů. Technika zahrnuje 4 základní kroky: 1) restrikce DNA zpravidla dvěma restrikčními enzymy (nejčastěji *EcoRI* a *MseI*), 2) ligace s oligonukleotidovými adaptory za přítomnosti restriktáz tak, aby nedocházelo k opětovnému spojení restrikčních fragmentů 3) selektivní amplifikace pomocí selektivních AFLP primerů a 4) vizualizace amplifikovaných fragmentů buď za pomoci nedenuroujícího polyakrylamidového gelu nebo fragmentační analýzy (Šmarda et al., 2008). V případě využití fragmentační analýzy je nutné použít fluorescenčně značený primer (viz fragmentační analýza).

U metody AFLP není potřeba znalosti nukleotidové sekvence, proto se tato metoda stala velmi vyhledávanou a vhodnou pro DNA libovolného původu stupně complexity, využívanou jak v diagnostice, tak pro fylogenetické a taxonomické studie (Weising et al., 1995). Jako přelomová technika k identifikaci odrůd byla popsána Powellem et al. (1996). Díky vysokému počtu fragmentů – na gelu obvykle 50-100, fragmentační analýza může být ještě citlivější, má vysokou vypovídací schopnost (Vos et al., 1995).

Nevýhodou této metody je její pracnost, vysoké náklady, a právě díky velkému počtu kroků v analýze i pravděpodobnost vzniku chyby při práci.

2.3 Hodnocení molekulárních markerů

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda používání k separaci DNA, RNA nebo bílkovinných molekul (Lodish et al., 2013). Složení a poréznost gelu je volena s ohledem na specifickou váhu a složení analyzovaného vzorku. Použité gely, nejčastěji akrylamidové nebo agarózové, se mohou lišit v koncentracích podle toho, jaký typ molekul chceme oddělit (Robyt a White, 1990).

Většina výsledků PCR je ověřována právě pomocí gelové elektroforézy, jako rychlé a jednoduché metody. Podle dalšího využití amplifikované směsi, lze po obarvení nanést na gel část (např. pro další využití při PCR-RFLP nebo čipovou

elektroforézu) a nebo všechnu reakční směs (Brown, 2006). Je možné ji použít jako metodu separativní, např. před hmotnostní spektrometrií, klonováním, sekvenováním DNA, nebo metodou Southern Blot (Lodish et al., 2013).

Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohu separovaných molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejčastěji používaným barvivem je ethidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex. Namísto nebezpečného ethidium bromidu mohou být pro barvení použita další barviva např. SYBRGreen, který je sice méně nebezpečný, ale pro vyhodnocování není dostatečně stabilní (Šmarda et al., 2008). Pokud jsou vzorky označené fluorescenčně, lze je na gelu vyfotografovat pod ultrafialovým světlem. Jsou-li separované molekuly označeny radioaktivní značkou, bývají zaznamenány v podobě autoradiogramu (Lodish et al., 2013).

Čipová elektroforéza

Poprvé byl princip čipové elektroforézy představen v roce 1992 Harrisonem (Harrison et al., 1993). K separaci dochází v kanálcích vyleptaných do čipu. Hlavním zdrojem separace je elektroforéza, která může probíhat dvěma způsoby. Buď prostřednictvím kontaktu elektrod se základním elektrolytem, kdy jsou vzorky nanášeny do systému kanálků a následně elektrokineticky vpraveny do injektorové oblasti, kde probíhá vlastní elektroforetická separace, nebo pomocí velikosti napětí, kdy dochází k automatickému nanášení vzorků pomocí mechanického ramene na čip. Při elektroforéze na čipu je možné dosáhnout vysoké účinnosti při aplikaci vysokého napětí, přestože je separační kanál krátký. Čipová elektroforéza umožňuje analýzu několika desítek vzorků současně. Velkou výhodou je minimální objem analyzovaných vzorků v řádu mikrolitrů (Wu et al., 2008).

Většina používaných mikročipů byla vyrobena ze skla nebo křemene pomocí fotolitografie, mokřím leptáním nebo tepelným leptáním. Z důvodu vysokých nákladů a komplikovaných postupů výroby jsou však tyto materiály nahrazovány vhodnějšími polymery. Ty jsou oproti sklu a křemíku tvárnější, lehčí a jejich výroba je ekologičtější. Jejich nespornou výhodou je vynikající optická transparentnost (Chen et al., 2006).

Čipová elektroforéza získala na popularitě díky svému všestrannému využití např. monitoring životního prostředí, biomedicínské a farmaceutické analýzy, klinická

diagnostika či forenzní šetření. Tímto způsobem lze separovat proteiny, DNA i RNA (Chang et al., 2010).

Fragmentační analýza

Pro fragmentační analýzu probíhající v genetickém analyzátoru je potřeba naznačit jednotlivé fragmenty fluorescenčně značenými primery, tzv. fluorofory, které při průchodu kapilárou a po ozáření laserem emitují světlo různé barvy (Schuelke, 2000; Blacket et al., 2012). Výstupem je chromatogram s „píky“ jejichž poloha je porovnána se známým standardem, což je soubor fragmentů známé délky značený odlišnou fluorescenční barvou analyzovaný společně se vzorkem. Tímto způsobem můžeme určit typ alely daného polymorfismu specifického pro testovaný chromozom. Pokud je používáno více značených primerů (standardně 6-FAM, VIC, NED, PET), je možné dosáhnout výrazného snížení nákladů pro analýzu, protože lze využít takzvaného multiplexu, tedy analýzy několika (4) PCR produktů v jednom kroku (Butler 2005; Jozová et al., 2014).

3. Systém AI/AK

Autoinkompatibilita (AI) charakterizuje neschopnost rostlin dosáhnout opylení vlastním pylem neboli samosprášení. AI je v podstatě geneticky podmíněný mechanismus, který umožňuje rostlinám rozeznat a odmítnout vlastní pyl (Zhang et al., 2013).

3.1 Systém AI/AK u rostlin

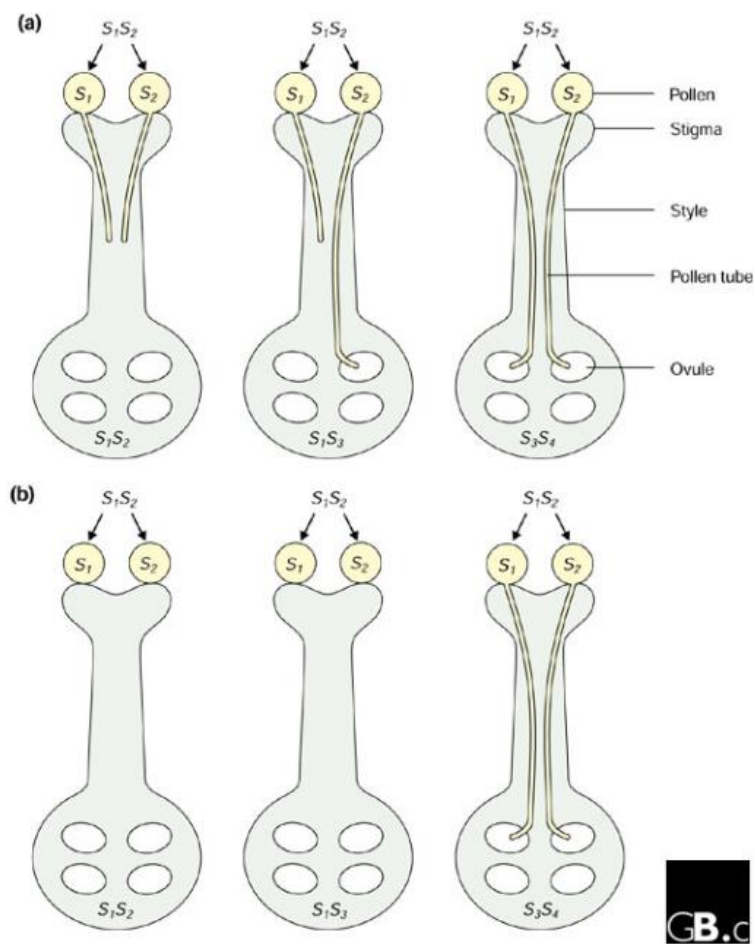
První zprávy o autoinkompatibilitě (AI) pocházejí již od Darwina, ovšem termín inkompatibilita zavedl jako první v roce 1917 Stout při studiu fertility u *Cichorium intybus* (čekanka obecná). Autoinkompatibilita se vyskytuje napříč celou rostlinnou říší. Tento mechanismus byl nalezen u 90 z 320 čeledí vyšších rostlin (Řepková, 2013). Hlavní roli při AI reakci hrají povrchové buňky blizny a tapetální vrstva buněk, která vytváří povrchovou vrstvu pylu (Sobotka et al., 2000). Různé skupiny rostlin si pro účely AI vytvořily vlastní, velmi odlišné mechanismy. Rozdíly jsou ve způsobu rozeznávání pylu i v reakci na něj (Udagawa et al., 2010).

U rostlin je známo několik AI systémů a jejich modifikací. Tyto systémy se dělí na gametofytické (GI) a sporofytické (SI) (obrázek 4). U rostlin se sporofytickým typem AI je inkompatibilní reakce velmi rychlá (v minutách). Pylové zrno je blokováno již na povrchu blizny. V mnoha případech ani nevyklíčí. Tento typ je znám většinou u rostlin, které mají suchý povrch blizny na rozdíl od rostlin s gametofytickým typem, které mají bliznu zvlhčenou a dochází tak k vyklíčení pylu. Rozpoznána a blokována je až pylová láčka prorůstající čnělkou (Watanabe et al., 2012). Prorůstání pylových láček je řízeno alelami obsaženými v pestíku. Reakce pylových zrn je určena genotypem celé otcovské rostliny (sporofytu) bez ohledu na to, která z přítomných alel připadla na pylové zrno v průběhu redukčního dělení. Tento typ AI je geneticky značně komplikovaný dominantními vztahy mezi alelami a výskytem modifikačních genů (Newbiggin et al., 1993; Havel, 1998). Mezi rostliny sporofytického typu patří čeledi: *Asteraceae*, *Convolvulaceae* a právě *Brassicaceae*. Gametofytický typ AI můžeme nalézt u čeledi: *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Mimosaceae*, *Papaveraceae*, *Fabaceae* (Proctor et al., 1996). Dále lze mechanismus AI rozlišit také na heteromorfní a homomorfní. Toto rozlišení se vztahuje pouze k morfologii květu (Wolko a Slomski, 2012).

Heteromorfní inkompatibilita zahrnuje znaky, jako jsou např. velikost a tvar pylových zrn a buněk blizny. Nejzřetelnější je však projev v délce čnělky, nebo-li

heterostylie. U tohoto mechanismu nedochází k oplození ani při samoopylení, ani při cizosprášení mezi morfologicky stejnými rostlinami. U hospodářky významných rostlin se vyskytuje jen zřídka. Naopak homomorfní inkompabilita je u hospodářsky významných rostlin častá. Vyskytuje se především u čeledí *Asteraceae*, *Brassicaceae* a *Convulvulaceae*. Inkompabilita je kontrolována jedním lokusem s několika alelami. Jejich počet je obvykle menší než v jednolokusovém gametofytickém systému, ačkoliv u druhu *Brassica oleracea* bylo zjištěno více než 50 alel. Všechny pyl vykazuje stejnou reakci, jak inkompabilní, tak kompatibilní. Tato reakce je dána díky diploidnímu genotypu, na kterém pyl vznikl. Dvě alely mohou působit buď nezávisle, nebo spolupůsobit tak, že jedna je dominantní nad druhou v pylu i v pestíku. Recesivní alela je v tomto případě inaktivní (Brugiére et al., 2000; Řepková, 2013).

Autoinkompabilita je geneticky determinována jedním nebo více lokusy, které se označují jako *S* lokusy (sterility locus). U některých druhů byl počet alel lokusu odhadnut až na 200. Jeden lokus může být tvořen skupinou několika vázaných genů. Diploidní rostliny mají vždy dvě alely (Řepková, 2013).



Hiscock (2002)

Obrázek 4 Princip kontroly přijímání pylu

- a) Princip přijímání či odmítání pylu u gametofytického fenotypu: K blokaci pylového zrna dochází již na povrchu blizny.
- b) Princip přijímání/odmítání pylu u sporofytického fenotypu: Rozpoznána a blokována je až pylová láčka prorůstající čnělkou.

3.2 Systém AI/AK u řepky olejky

První zmínky o autoinkompatibilitě u rodu *Brassica* popsal Stout v roce 1920 při studiu druhu *Raphanus sativus*. Ovšem princip mechanismu popsal Bateman v roce 1954 při zkoumání druhu *Ibersi amara*, své výsledky aplikoval na rod *Brassica*, kde došel k závěru, že systém AI je kontrolován jedním lokusem (Nasrallah, 2011). U druhu *Brassica napus* byl tento princip popsána též v 50-tých letech Olsonem jako úplná inhibice vývinu pylových láček při samoopylení rostlin (Kitashiba a Nasrallah, 2014). U řepky je AI systém tzv. homomorfní, tzn., že květy řepky jsou převážně uniformní a heterostylie u nich není pozorována. Princip funkce AI reakce u řepky není dosud zcela objasněn. Může to být aktivizace, resp. deaktivace specifických enzymů, nebo systém

podobný imunologické reakci. Také je zde možnost vymizení pozitivní stimulace růstu pylové láčky při interakci příbuzných genových produktů (Havel, 1998). Při opylení rostlin řepky dojde nejprve k rozpoznání S fenotypu. Rozpoznávací systém u brukvovitých je kontrolován klasickým mendelistickým lokusem, který nese více jak 80 alel (Nou et al., 1993)

Podle síly AI reakce lze jednotlivé alely rozdělit do dvou skupin. První typ má silnější AI reakci s dominancí nad typem druhým. Průměrný počet semen v šešuli se pohybuje u prvního typu od 0 do 10-ti semen, u druhého je to pak od 10 do 30-ti semen (Nasrallah, 1991).

Přirozený výskyt AI rostlin v odrůdách ozimé řepky je velmi nízký, kolem 0,1%. Moderní liniové odrůdy jsou prakticky zcela samosprašné. Aktivní S alely, podmiňující vysoký a stabilní stupeň AI, mohou být do genomu *Brassica napus* introdukovány resyntézou řepky z původních druhů *Brassica oleracea* a *Brassica rapa*. Ověřuje se též možnost přenosu účinných S alel transgenozí. Schůdnější cestou je vyhledávání AI genotypů ve starších odrůdách či šlechtitelských materiálech ozimé řepky. Vybrané AI rostliny a jejich inbreedingem získaná potomstva vykazují vzhledem k založení AI recesivními S alelami různou úroveň pseudokompatibility, ovlivňovanou podmínkami prostředí a genetickým pozadím (Kučera et al., 1998).

3.3 Způsoby kontroly AI/AK

Nezbytnou podmínkou pro úspěšné využití AI systému v praktické výrobě hybridního osiva je možnost spolehlivě překonat AI reakci a tím zajistit rozmnožování AI linií. Na projev AI reakce má vliv mnoho faktorů – teplota, vlhkost, různé chemické látky, elektrický proud, opylení směsí pylu apod. V experimentálních podmínkách je překonání AI reakce pro rozmnožování AI linií nejčastěji zajištěno nuceným samosprašením v poupěti. Zde je využívám fakt, že blizna v poupěti je již schopna přijímat pyl a AI zábrany ještě nejsou plně rozvinuty. V provozních podmínkách je pak možno využít buď zvýšení koncentrace CO₂ ve vzduchu, nebo postřik květů roztokem kuchyňské soli (Havel, 1998).

Účinným nástrojem pro šlechtění a selekci žádoucích rostlin s funkčním projevem autoinkompatibility (obsahující funkční recesivní S haplotyp) je postup založený na využití molekulární analýzy. Selekcční markery je možné detekovat v raných fázích ontogeneze a vhodnou kombinací molekulárního a klasického

šlechtitelského postupu lze docílit účinné a přesné selekce (Čurn et al., 2014). K hybridnímu šlechtění jsou vhodné pouze AI linie s vysokou účinností AI reakce, aby byl podíl hybridního osiva maximální i v polních podmínkách. Podíl hybridního osiva je možno stanovit prakticky pouze na základě vhodného genetického markeru (Havel, 1998).

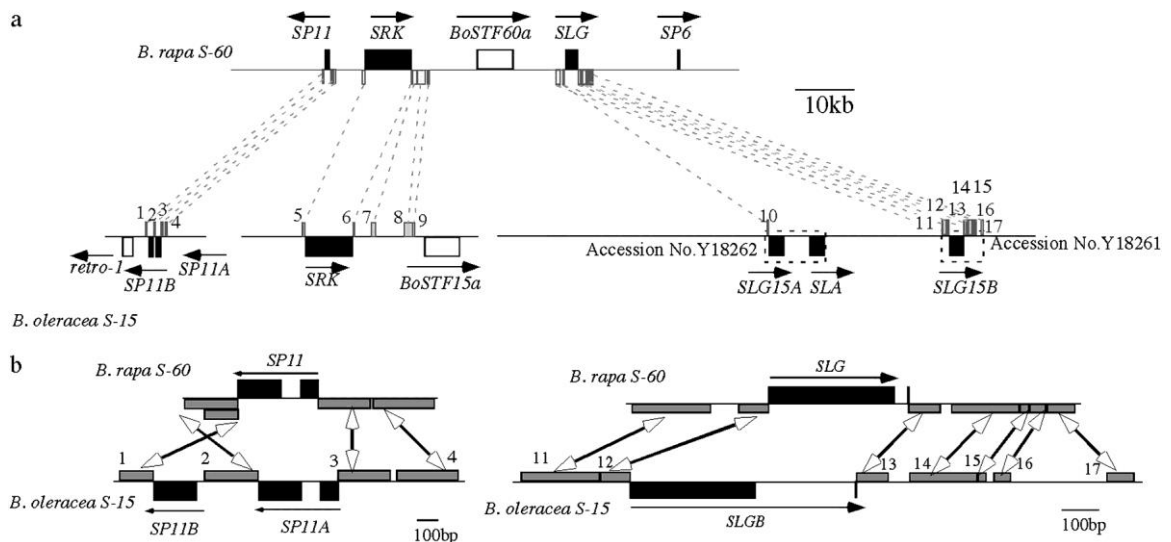
3.4 S-lokus

Autoinkompatibilita je kontrolována jediným úsekem DNA tzv. S lokusem, který má velký počet alel (Čurn et al., 2014). Konkrétně u druhu *Brassica napus* je uváděna detekce 50-ti alel (Nou, 1993). S haplotypy u rodu *Brassica* jsou podle svého fenotypového účinku na základě klasické genetické analýzy rozděleny do dvou tříd: I a II (Nasrallah, 1991). S haplotypy třídy I jsou dominantní nad třídou II (Nasrallah, 1993). Většina pěstovaných genotypů řepky pak obsahuje v A genomu S haplotypy třídy I (homologní s S haplotypem S₄₇ *B. rapa*) a v C genomu S haplotypy třídy II (homologní s S haplotypem S₁₅ *B. oleracea*) (Zhang et al., 2011). Autoinkompatibilita u řepky je pak vyvolána mutací v dominantním S haplotypu, která vede k supresi funkčního recesivního S haplotypu (Okamoto et al., 2007).

Doposud bylo na S-lokusu *Brassica napus* lokalizovaná přes dvě desítky genů a počet ještě pravděpodobně není konečný. Pro mechanismus AI se zdají být klíčovými tři geny – *SLG*, *SRK* a *SCR* (Sobotka et al., 2001). Geny *SLG* a *SRK* se podílejí na schopnosti blizny rozeznat příbuzný a nepříbuzný pyl. Oba geny jsou vysoce polymorfní a jejich exprese byla zjištěna pouze na povrchu zralých blizen. U třetího genu – *SCR*, probíhá exprese pouze v prašnicích. Produktem je protein, který je považován za samčí determinatn AI (Zhai et al., 2014).

U čeledi *Brassicaceae* je skupina genů strukturně příbuzných s *SLG* a *SRK*, komplexní multigenová rodina exprimující se jak v generativní tak ve vegetativních pletivech. Tato skupina je pravděpodobně zapojena v různých mechanismech rozpoznávání pylu a buněk čnělky. Geny jsou sekvenčně příbuzné s *SLG*, nejsou však geneticky vázané na S lokus, neboť jsou lokalizovány na jiném chromozomu. Jsou označovány jako *SLR* (*S*-locus related). Byly analyzovány tři geny – *SLR1*, *SLR2* a *SLR3*. *SLR1* gen je exprimován v blizně a produktem je glykoprotein sekretován podobně jako *SLG* do buněčné stěny papilárních buněk. Tento gen ovšem nevykazuje takový stupeň polymorfismu jako *SLG* gen. Další z genů – *SLR2* je v těsné vazbě

s genem *SLR1* k expresi dochází v blizně. Exprese *SLR3* genu byla zjištěna i ve vegetativních orgánech. Geny a jejich produkty jsou zapojeny do mechanismu tvorby adhezivní vrstvy na blizně, která umožňuje kontakt pylu a papilárních buněk blizny (Řepková, 2013; Kitashiba a Nasrallah, 2014).



Fujimoto et al. (2006)

Obrázek 5 Porovnání genomu S-lokusu mezi *B. rapa* a *B. oleracea*

- a) Obrázek ukazuje porovnání struktury genomu mezi *B. rapa* S-60 a *B. oleracea* S-15. Stínované části označují regiony, které mají vysokou podobnost mezi oběma geny. Tmavé oblasti označují geny *SLA*, *SLG*, *SP11* a *SRK*. Tyto oblasti jsou číslovány 1 až 17. U těchto oblastí byly zjištěny následující délky: 1-253 bp, shoda 95,7%; 2-158 bp, 95,7%; 3-245 bp, 90,6%; 4-295 bp, 83,0%; 5-393 bp, 90,7%; 6-213 bp, 97,2%; 7-743 bp, 93,0%; 8-1376 bp, 93,3%; 9-270 bp, 92,3%; 10-69 bp, 93,9%; 11 až 827 bp, 92,1%; 12 až 317 bp, 88,4%; 13 až 337 bp, 94,1%; 14 až 708 bp, 87,9%; 15-91 bp, 97,8%; 16 až 169 bp, 97,0%; 17 až 284 bp, 91,6%.
- b) Podrobné srovnání *SP11*, *SLG* a jejich doprovodných regionů. Tmavé oblasti představují exony *SP11* a *SLG*. Stínované rámečky označují oblasti homologní mezi *B. oleracea* S-15 a *B. rapa* S-60.

3.4.1 Geny spojené s AI/AK

SLG

Jako první byl při studiu S-lokusu popsán v 1985 gen *SLG* (S-locus glykoprotein). Jeho délka je cca 1,3 kb a kóduje specifický protein o velikosti 55 kDa. Tento gen je vysoce polymorfní. Ačkoliv v prašnicích byla zjištěna nízká úroveň mRNA tohoto genu, jeho exprese byla zjištěna pouze na povrchu zralých blizen. V ostatních částech rostlin nebyla exprese genu nikdy detekována (Řepková, 2013).

Ikdyž je tento gen vysoce polymorfní, přesto má vždy 12 cysteinových zbytků na stejné pozici. To by mohlo svědčit o významu pro formování terciální struktury nutné pro normální funkci glykoproteinu. Dále existuje několik N-glykosilačních míst a dvě místa konzervovaná (Kusaba et al., 1997).

Podle sekvenační podobnosti byly *SLG* geny rozděleny do dvou tříd – I a II. Vzájemná podobnost těchto skupin je pouze 65% v předpokládané aminokyselinové sekvenci. Zatímco *SLG* geny třídy I jsou dominantní, všechny identifikované *SLG* geny třídy II pocházejí z recesivních haplotypů. Tento jev je charakteristický právě pro rod *Brassica* (Okazaki et al., 1999). S tímto zjištěním pravděpodobně souvisí i to, že žádný z *SLG* genů třídy I neobsahuje intron, zatímco u *SLG* genů třídy II je charakteristický intron o velikosti cca 200 bazí na 3'-konci (Hatakeyma et al., 1998). Expresované *S*-lokusové glykoproteiny mezi dvěma třídami lze rozlišit použitím monoklonálních protilátek (Kandasamy et al., 1989).

Po charakterizaci AI rostlin, které expresují velmi nízkou úroveň *SLG* a na druhou stranu po objevu přirozeně autoinkompatibilních haplotypů, které expresují vysokou úroveň *SLG* se začala zkoumat skutečná role *SLG* genu v AI reakci. Následné objevy pak vedly k návrhu, že klíčovou roli při AI reakci nehraje gen *SLG*, ale gen *SRK* (Gaude et al., 1995). Je dokonce potvrzeno, že každá *SLG* alela projevuje vyšší podobnost k *SRK* alele stejného haplotypu, než k jakékoliv jiné alele *SLG*.

Od tohoto *SLG* genu je odvozeno několik dalších genů, které mají velice podobnou sekvenci nukleotidů. Společný znak pro tyto geny je exprese v prašnicích a povrchové vrstvě blizny. Tyto geny se liší umístěním v genomu, které jsou lokalizovány mimo *S*-lokus. Tyto geny se nazývají jako geny s *S*-lokusem spřízněné – *SLR*. Definovány byly tři geny – *SLR1*, *SLR2* a *SLR3*, přičemž gen *SLR3* je exprimován nejen v prašnicích a papilárních buňkách blizny, ale i v dalších pletivech a proto se od ostatních základní charakteristice vymyká (Cock et al., 1995)

SRK

Gen *SRK* (*S*-locus kinasa receptor) kóduje membránový protein, který je u rodu *Brassica* nutný pro AI odpověď. Poprvé byl popsán Steinem v roce 1991. *SRK* protein se skládá ze tří domén. První část, též nazývaná jako *S*-doména, je reprezentována glykosilátovou extracelulární doménou. Tato doména je na 90% podobná s *SLG* genem (Tian et al., 2013).

Stejně jako všechny ostatní geny tzv. S-genové rodiny, tak i část genu *SRK* obsahuje 12 konzervativních cysteinů a dvě konzervativní N-glykosilační místa podobně jako u *SLG* genu. Druhou částí je transmembránová doména, která je spojena se třetí částí, doménou cytoplasmatickou, která je sekvenčně blízká proteinovým kinázám (Goring a Rothstein, 1992).

SRK gen je příbuzný s rostlinnými kinázami, které se podílejí na obranném mechanismu vůči patogenům. Obranné systémy u AI mechanismu jsou založeny na rozpoznávací reakci. Proto někteří autoři soudí, že by AI mohla mít původ v mechanismech obrany proti patogenům (Pastuglia et al., 1997).

Některé výzkumy prokázaly, že v S3 haplotypu u druhu *B. oleracea* kóduje gen *SRK* zkrácenou formu, tzv. eSRK protein (extracellular domain of SRK). Tyto proteiny vznikají pravděpodobně alternativním sestřihem SRK transkriptů. Tento protein není vázán na membránu, jedná se pouze o S-doménu. Podobné proteiny s kinázovou aktivitou jsou přítomny i v živočišných signálních drahách (Giranton et al., 1995). Role genu *SRK* v systému AI nebyla ještě jednoznačně rozpoznána (Zhang et al., 2013; Rea a Nasrallah, 2015).

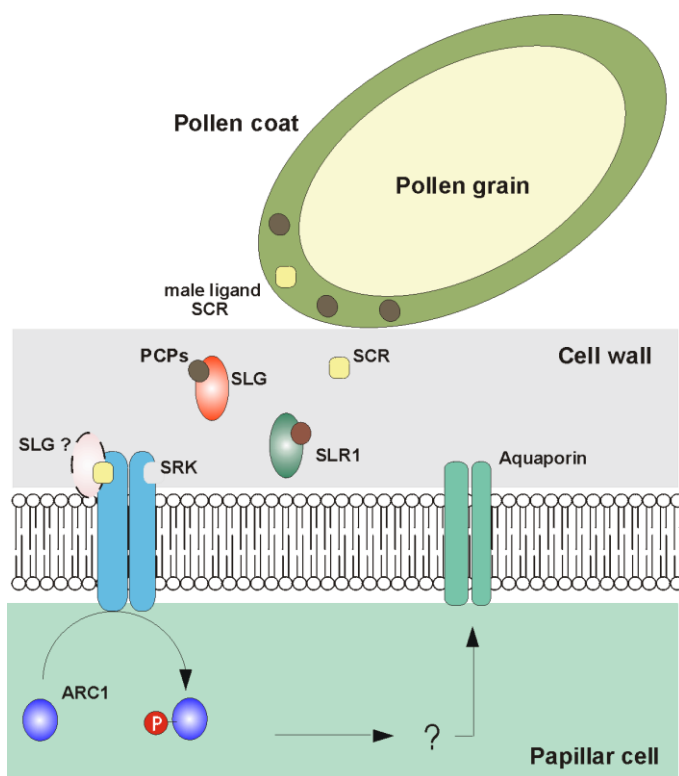
SCR/SP11

SCR gen (*S*-locus cysteine-rich protein), který byl poprvé popsán Schopferem v roce 1999 lze též nalézt pod označením *SP11* gen. Je pravděpodobné, že tento gen *S*-lokusu hraje významnou roli v AI reakci. Někdy je gen *SCR* označován jako samčí determinant. Stejně jako geny předchozí, i tento je vysoce polymorfní. Pro tento gen je charakteristický konzervativní úsek, který obsahuje osm cysteinových zbytků. Zároveň je i v silné genové vazbě s geny *SLG* a *SRK*. K expresi dochází na prašníku. Přepisem vznikají specifické proteiny pláště pylu, které mají charakteristickou prostorovou strukturu danou konzervativními cysteinovými zbytky. Tento typ proteinů se nazývá PCP (pollen coat protein). Exprese probíhá v buňkách tapetální vrstvy prašníků. Tyto buňky poté produkují protein při vytváření pylu. *SLG* a *SRK* proteinový komplex na zralé blizně disponuje silnou afinitou k PCP proteinům. Pokud je na takovém komplexu zaregistrován vlastní pyl, nedojde k jeho vývoji. Přitom nezáleží na *S*-haplotypu rostliny (Schopfer et al., 1999).

Důkaz o funkčnosti genu *SCR* jako samčího determinantu AI byl potvrzen dvěma různými přístupy. V prvním případě došlo k transformaci jedince S₂ haplotypu genem *SCR* z S₆ haplotypu. Pyl transformovaných S₂ rostlin získal S₆ specifitu, byl

odmítán rostlinami S_6 haplotypu. Fenotyp transformované rostliny se přitom nijak nezměnil (Schopfer et al., 1999). Za druhé se podařilo uměle vyvolat AI reakci použitím rekombinantního SCR proteinu z *E.coli*. Pokud byl rekombinantní protein stejného haplotypu jako opylovaná rostlina aplikován k papilárním buňkám, byl blokován jakýkoliv pyl (Takayama et al., 2000).

Předpokládá se, že SRK a SLG tvoří receptorový komplex, který je v analogii s intercelulárními signálními mechanismy u savců. Pokud dojde k opylení inkompatibilním pylem, je samčí determinant SCR navázán na receptor SRK. Dojde k aktivaci, spuštění signalizační kaskády a následné inhibici pylu. Protein SLG pravděpodobně vytvoří komplex s S-doménou SRK a tím podpoří proces rozpoznání. Protože protein SRK se zdá být značně nestabilní, mohl by SLG napomáhat akumulaci SRK v papilárních buňkách na fyziologicky relativní hladinu (Dixit et al., 2000). S tímto by mohly souviset výzkumy, které probíhají v posledních deseti letech, které se zaměřili na studium regulátorů (obrázek 6 a 7)

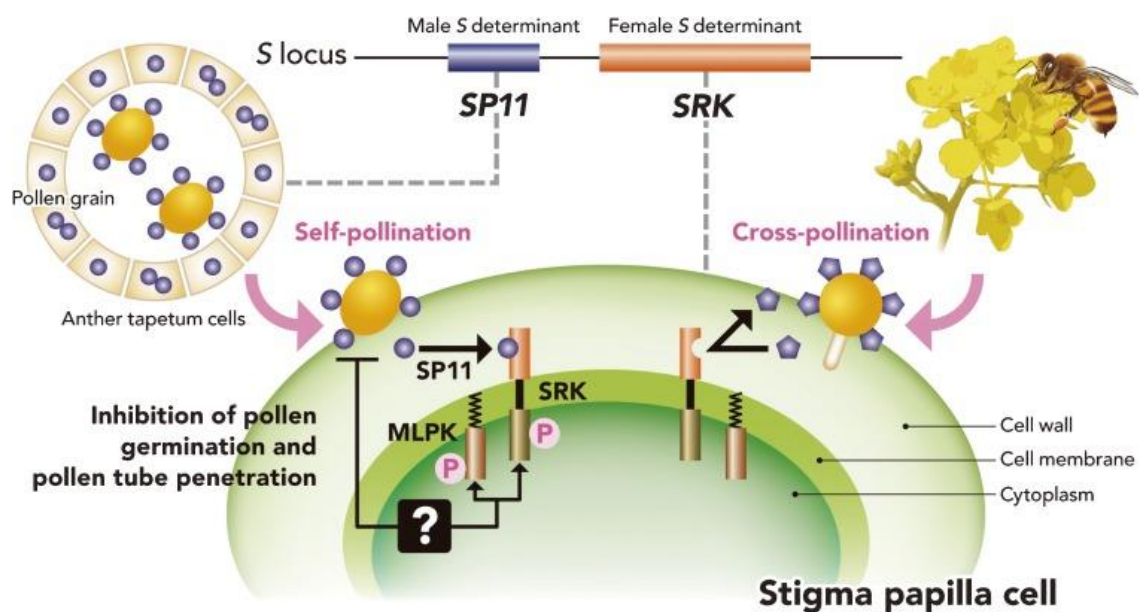


Sobotka et al., 2001

Obrázek 6
Model vytvořený v roce 2001 zobrazuje hypotetické interakce mezi SLG, SRK, SLR1 a samčím determinanem na povrchu papilární buňky. Šipky znázorňují signální dráhu

iniciovanou aktivací SRK, která končí u membránového proteinu aquaporinu (MOD). Tyto proteiny vytvářejí v cytoplazmatické membráně kanály pro transport vody.

Doposud bylo rozpoznáno šest proteinů, které jsou v interakci s SRK-lokusem, mezi ně patří: ARC1 (arm repeat containing 1), MLPK (*M* locus protein kinase), THL1/2 (thiredoxin h-like 1/2), KAPP (kinase-associated protein phosphatase), calmodulin a SNX1 (sorting nexin 1). Ovšem pouze u ARC1 a MLPK byla zjištěna pozitivní regulace systému autoinkompatibility (Zhang et al., 2013; Gao et al., 2016).



Watanabe et al., 2012

Obrázek 7 Schematický model pro rozpoznání samoopylení u brukvovitých rostlin.

Samčí a samičí determinanty SP11 a SRK se nacházejí na S-lokusu. SP11 je převážně exprimován v buňkách tapeta, které se během zrání pylu hromadí na povrchu. Při samoopylení prostupují molekuly proteinu SP11 do buněčné stěny, kde pravděpodobně dochází k interakci s SRK. Fosforilovaný SRK protein interaguje s MLPK. Po přenosu signálu dochází k odmítnutí vlastního pylu, tento proces však nebyl dostatečně prostudován.

Obrázek 7 ukazuje současný stav rozpoznávání vlastního pylu. Prokázala se přítomnost regulátoru MLPK.

MLPK, neboli *M* lokus protein kinase je jeden z proteinů, který je v interakci s SRK a je zapotřebí při pozitivní regulaci autoinkompatibility u rodu *Brassica*. U *B. rapa* se diferencují dva různé transkripty: *MLPKf1* a *MLPKf2* (Gao et al., 2016). Tento protein byl objeven díky postupnému klonování modifikačních (*mod*) mutací u druhu

Brassica rapa. Tyto recesivní mutace vedly k dalšímu porozumění systému AI. MLPK pravděpodobně kóduje kinázy patřící do rodiny receptor-like cytoplasmatic kinase (RLCK) a byla u nich zjištěna serin/threonin kinázová aktivita (Samuel et al., 2008). Tento regulátor se vyskytuje ve dvou izoformách vzniklých na počátku transkripce. Obě izoformy jsou umístěny na plazmatické membráně buď na N-konci hydrofóbní domény a nebo vázané na myristoylation. Ve finále byla aktivita SRK kinázové domény prokázána účinnou fosforylací MLPK in vitro a byla tak potvrzena interakce mezi MLPK a SRK pro systém AI (Shi et al., 2016).

Dalším proteinem, který interaguje s SKR je již dříve prokázaný **ARC1**. Tento protein je specificky fosforylovaný kinázovou doménou různých alel (Shi et al., 2016). Důkaz o zapojení proteinu v AI systému byl prokázán pomocí transformace antisence genu k ARC1 Transformované AI linie neblokovaly hydraci pylu (Stone et al., 1999). Na C-koncové oblasti byl nalezen motiv, který se účastní proteinových interakcí v různých systémech (Kitashiba a Nasrallah, 2014). N-koncová doména pak interaguje v dalším kroku signální dráhy, kde se vyskytují proteiny z rodiny aquaporinů (Shi et al., 2016).

3.5 Využití AI/AK v hybridním šlechtění řepky

Ozimá řepka je z důvodu přirozené inkompability velmi vhodná plodina pro hybridní šlechtění. Mimo jiné má vysoký množitelský koeficient, je u ní znám heterózní efekt a existence geneticky podmíněných systémů autosterility, využitelných pro řízení oplození. První hybridní jarní řepky vytvořené na základě AI, byly zavedeny v Kanadě (Ondřej et al., 1999). Vlivem heterózního efektu může být výnos semen u řepky vyšší až o 60-70% oproti rodičovským liniím. Hybridní kombinace dosahují 15-20% přírůstku výnosu v porovnání s nejlepšími liniiovými odrůdami. Vzhledem k biologii kvetení není technicky možné využít ve větší míře ruční kastrace květů a umělého opylování, z tohoto důvod je tedy velmi vhodné využívat mechanismů autosterility (Voškeruša, 1992).

Mechanismus AI oproti CMS umožňuje vyhnout se problémům s obnovou fertálních hybridů, kvalitou semene a efektivností výroby hybridního osiva. Při používání AI mohou být rodičovské komponenty vysévány na hybridizačním poli ve směsi, což zlepšuje efektivitu výroby osiva (Sobotka et al., 2001).

Pro účely šlechtění je někdy třeba zavést inkompatibilitu do odrůdy anebo posílit již stávající inkompatibilitu. Někdy se může inkompatibilita vyskytovat u planě rostoucích příbuzných druhů. V tomto případě se přenos alel uskuteční vnitrodruhovým nebo mezidruhovým křížením (Řepková, 2013).

V současné době je šlechtění řepky zaměřeno na tvorbu F₁ hybridů. Při produkci hybridního osiva je nutné zamezit samosprašení (Čurn et al., 2010). K hybridnímu šlechtění jsou vhodné pouze AI linie s vysokou účinností AI reakce tak, aby byl podíl hybridního osiva maximální i v polních podmínkách. Podíl hybridního osiva je možné stanovit pouze na základě vhodného genetického markeru (Čurn et al., 2014).

Použití AI jako systému pro produkci hybridního osiva řepky závisí především na získání sady stabilních AI linií s účinným S-haplotypem. Jednou z možností, kterou lze při šlechtění využít, je vyhledání AI genotypů v populacích odrůd, nebo šlechtitelského materiálu řepky. Přirozený výskyt AI rostlin v odrůdách řepky je velmi nízký. Moderní liniové odrůdy jsou téměř samosprašné. Zdrojem mohou být staré odrůdy. U nich může být ale problémem špatná udržitelnost tohoto mechanismu a návrat ke kompatibilitě (Havel, 1996). Jinou možností pak může být mezidruhová hybridizace, či resintéza z původních druhů. V těchto případech je třeba provádět několika generační zpětné křížení s intenzivní selekcí (Kott, 1995).

3.6 Molekulární markery využívané při hodnocení AI/AK

Účinným nástrojem pro šlechtění a selekci žadoucích AI genotypů je postup založený na využití molekulární analýzy (Čurn et al., 2010).

Pro analýzu S-alel lze použít několik biochemických a molekulárně biologických metod. Používá se např. elektroforetická analýzy proteinů (např. produktů genu *SLG*). Tato metoda může být ovšem i díky tomu, že se nepoužívají specifické protilátky pro konkrétní polymorfní protein, nevhodná. Další významnou metodou je Southern hybridizace. Tato metoda ovšem vyžaduje dostatek vhodných sond. Nevýhodou je vysoká finanční i časová náročnost. Jednodušší metodou, která je vhodná i pro rutinní využití je metoda PCR-RFLP. Metoda je vhodným nástrojem pro předběžnou identifikaci S-haplotypu v rostlinném materiálu (Nishio et al., 1997). Díky metodě PCR-RFLP genu *SLG* a segreganční analýzy bylo zjištěno, že *SLG* geny třídy I pocházejí z dominantních haplotypů a *SLG* geny třídy II z recesivních haplotypů (Sobotka et al., 2001) Také byla díky této metodě prokázána existence vysokého stupně polymorfismu

(Watanabe et al., 2000). Ačkoliv je tato metoda překonána, i tak se stále v některých pracích objevuje, např. Panigrahi et al. (2011). Je to pravděpodobně dáno jednoduchostí a poměrně vysokou vypovídající schopností.

Další metodou, kterou lze využít pro hodnocení AI/AK, je klasická metoda PCR za použití specifických primerů, či její modifikace multiplex PCR. Tato metoda je založena na přítomnosti či nepřítomnosti fragmentu, který se vyskytuje pouze u AK rostlin. U AI rostlin, nesoucí pouze funkční recesivní *S* haplotyp pak tento fragment není amplifikován. Metoda multiplex PCR pak spočívá v přidání dalšího (kontrolního) primerového páru, který je přítomen u všech rostlin. Nevýhodou této metody je nutnost znalosti sekvence nukleotidů u analyzovaných druhů a podmínka nalézt vhodnou teplotu pro nasedání primerů tak, aby vyhovovala pro oba primerové páry a zároveň tak, aby nedocházelo k amplifikaci nespecifických fragmentů (Havlíčková et al., 2014).

Pro lepší pochopení fungování systému AI se používá v dnešní době velmi využívaného sekvenování (Kusaba et al. 2000; Nasrallah, 2000), díky němuž lze rozpoznat polymorfismus jak délkový, tak i polymorfismus nukleotidový. Díky této znalosti lze navrhnout specifické primery, či štěpná místa k využití pro PCR-RFLP. Vhodnou kombinací molekulárního a klasického šlechtitelského postupu lze docílit účinné a přesné selekce (Čurn et al., 2010)

4 Komentář k publikacím

První dvě publikace „Marker assisted selection as a tool for detection of *Brassica napus* plants carrying self-incompatibility allele, in hybrid breeding programs“ a „Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for identification of the class I S haplotype“ se zabývají problematikou detekce AI rostlin pomocí molekulárních markerů.

Cílem těchto prací bylo vybrat vhodný molekulární marker, který by dokázala selektovat AI/AK rostliny řízené funkční recesivní alelou již na začátku raného ontogenetického vývoje a vhodné rostliny použít k následnému hybridnímu křížení.

V prvním článku (Žaludová et al., 2013) byla pozornost zaměřena na geny *SLG* I, *SLG* II, *SCR* I a *SRK* I. Do analýzy bylo zahrnuto 120 DH linií. U těchto rostlin byl nejprve proveden semenný test, na jehož základě bylo identifikováno 75 AI rostlin, 29 AK rostlin a 16 rostlin, které nebylo možné rozpoznat. Pro PCR analýzu bylo celkově použito 5 specifických primerových párů.

Pro analýzu *SLG* I genu, který se vyskytuje u dominantních haplotypů, byl použit primerový pár PS5/PS15, který amplifikoval fragment o velikosti cca 1300 bp. Tento fragment se vyskytoval pouze u autokompatibilních rostlin. Dalším analyzovaným genem byl *SLG* třídy II pocházející z recesivních haplotypů. Pro tento gen byl použit primerový pár PS2/PS3, amplifikující fragment o velikosti 1100 bp. Bohužel díky přítomnosti recesivního S haplotypu u všech analyzovaných rostlin, byl tento marker vyřazen jako nevhodný pro hodnocení AI/AK rostlin a nebyl používán pro následné rutinní hodnocení. Pomocí těchto analýz došlo k jednoznačnému rozlišení AI a AK rostlin a úspěšnost semenného testu byla vyhodnocena na „pouhých“ 78,8%, kdy byla shoda fenotypového a genotypového hodnocení u 82 rostlin.

Druhým analyzovaným genem byl *SRK*, pro tento byl použit specifický primerový pár PK1/PK4. Byly amplifikovány fragmenty o velikosti cca 950 bp. Tento fragment byl amplifikován pouze u autokompatibilních rostlin stejně tak jako u *SLG* genu třídy I.

U třetího analyzovaného gen: *SCR*, bylo provedeno RT-PCR se specifickými primery F a R. Byl amplifikován fragment o velikosti 350 bp, který byl zaklonován a osekvenován. Na základě této sekvence byl navrhnut nový specifický primerový pár 2a/2b. Tento primer je specifický pro funkční alelu, která je charakteristická pro

autoinkompatibilní linii odrůdy Tandem. Amplifikoval se pouze jeden fragment o velikosti cca 280 bp, který byl pouze u autoinkompatibilních rostlin.

Druhá publikace: „Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for detection for identification of the class I S haplotype“ byla zaměřena na analýzu *SLG* genu třídy I. Celkem bylo hodnoceno 269 rostlin F2 generace DH linií získaných za pomoci mikrosporové embryogeneze, které byly dle semenného testu rozděleny do tří skupin na základě počtu semen v šesuli. Autoinkompatibilní rostliny (119), autokompatibilní (113) a rostliny, u nichž nebylo jednoznačně určit kompatibilitu (37).

Byla provedena duplex PCR reakce, se dvěma primerovými páry. Jeden pár amplifikoval fragment o velikosti cca 1100 bp. Tento primerový pár (SLGa) amplifikovat fragment pouze u autokompatibilních rostlin. Druhý primerový pár (SCO3), amplifikoval fragment o velikosti 750 bp. Tento amplikon se vyskytoval u všech analyzovaných vzorků a sloužil jako kontrola.

Na základě těchto analýz, stejně jako v analýzách předchozích, došlo k jednoznačnému rozlišení AI a AK rostlin.

Pokud porovnáme tyto dva přístupy k hodnocení AI/AK systému, lze druhý přístup vyhodnotit jako vhodnější i na základě spolehlivější detekce díky využití duplex PCR.

Výsledky z těchto analýz mají velký přínos pro šlechtitele nejen z toho důvodu, že jednoznačně dokáží rozlišit AI a AK rostliny, ale jejich nesmírnou výhodou je zachycení těchto rostlin již v rané fázi vývoje. Tudíž je možné nežádoucí rostliny vyřadit ze šlechtění již v počátečních fázích ontogeneze. Dojde tak k jednoznačné úspoře místa, času a zejména financí. V související publikaci (Havlíčková et al., 2015) bylo testováno velikost embrya, potřebná pro získání dostatečného množství DNA, ale zároveň nedocházelo k úplně destrukci embrya a bylo možné dopěstovat plnohodnotnou rostlinu schopnou další reprodukce. I tyto informace jsou velice důležité z hlediska dalšího rutinního hodnocení autoinkompatibility, ale i jiných systémů sterility u řepky.

Třetí publikace: „Genetic diversity Assessment in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Collection Using AFLP, ISSR and SSR Markers“ se podobně jako metodika: „Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity“ zabývá hodnocením genetické diverzity za využití molekulárních markerů v rámci novošlechtění.

Cílem tohoto výzkumu bylo otestovat a vybrat vhodné molekulární markery, které by dokázaly odlišit odrůdy řepky mezi sebou. Pro analýzu bylo vybráno 94 odrůd zahrnujících komerčně využívané odrůdy české i zahraniční, české staré odrůdy, jednonulové a dvounulové odrůdy, šlechtitelský materiál se změněným obsahem mastných kyselin, žlutosemenné odrůdy a CMS odrůdy. Jako molekulární markery byly zvoleny tři systémy: SSR, ISSR a AFLP.

Pro hodnocení genetické diverzity pomocí ISSR bylo nejprve otestováno 30 UBC primerů. Na základě této optimalizace byly vybrány 3 nejvhodnější primery (UBC 812, UBC 840 a UBC 845), které vykazovaly dostatečný polymorfismus, ale zároveň měli některé fragmenty, které se vyskytovaly u všech vzorků. Dalším kritériem pro výběr byla shodná nasedací teplota primerů. Počet fragmentů u použitých primerů se pohyboval mezi 5 až 30-ti fragmenty, celkový počet fragmentů 53. Na základě této analýzy jsme byli schopni jednoznačně odlišit jednotlivé odrůdy.

Další použitou metodou byl marker SSR. Tato analýza byla provedena službou. Na základě zaslaných výsledků bylo celkem hodnoceno 19 SSR markerů, které obsahovaly 5-10 alel, celkový počet 89 analyzovaných alel. Díky těmto poznatkům měla být tato metoda zavedena i do standardních analýz v rámci našeho pracoviště. Myšlenkou bylo využití SSR markerů o odlišné velikosti. Na SSR primery byl navázán univerzální primer, který byl značen fluorescenční barvou. Jelikož je pro fragmentační analýzu možnost značení až 4 různými barvami, při použití multiplexu PCR lze tedy dosáhnout snížení nákladů až na čtvrtinu, viz publikace “Multiplexová analýza mikrosatelitů u řepky pomocí modifikovaných fluorescenčně značených primerů“. Bohužel i po dlouhodobé optimalizaci nebylo dosaženo kýženého výsledku, jelikož použité primery byly zřejmě velmi konzervativní a na jejich základě nebylo možné vyhodnotit diverzitu.

Třetí a technicky i finančně nejnáročnější metodou použitou pro hodnocení genetické diverzity byl marker AFLP. U této analýzy byla opět provedena optimalizace na jejímž základě byly vybrány tři primerové kombinace: *EcoRI*+ACG/*MseI*+AGT,

EcoRI+ACG/*MseI*+ACC a *EcoRI*+ACG/*MseI*+ATT. U AFLP bylo oproti předchozím dvěma metodám amplifikováno výrazně více fragmentů a to 1003.

Ve výsledku došlo při použití tří molekulárních markerů k rozlišení všech analyzovaných odrůd a všechny markery vykazovaly polymorfismus. U AFLP to bylo 53,94 %, pro ISSR 90,57% a u SSR byly všechny alely 100% polymorfni. Na základě těchto hodnot byla vypočtena pomocí PCO analýzy matice vzdálenosti jednotlivých odrůd. Nejvyšší průměrná genetická vzdálenost byla zjištěna u ISSR markeru, nejnižší pak u SSR. Vyhodnocení jednotlivých markerů na základě vlastností je uvedeno v tabulce 2.

Zajímavostí u této analýzy bylo, že některé české odrůdy, respektive materiál šlechtěný na CMS vykazovaly poměrně vysokou podobnost vůči některým odrůdám vyšlechtěných ve Francii. To může být dáno tím, že CMS systém: *Ogu*-INRA, využívaný v českém šlechtění, pochází právě z Francie, tudíž mohou mít shodné rodičovské komponenty. Celkově došlo k rozdělení analyzovaného materiálu do čtyř základních klastrů První klastr obsahuje odrůdy českého původu pocházejících zejména z Výzkumného ústavu v Praze. K dalšímu klastrování došlo u evropských odrůd registrovaných v období 1999-2010, toto může dokazovat právě tendenci zužování genetické diverzity, kdy jsou ke šlechtění používány stále stejní rodiče. Je to pravděpodobně způsobeno tlakem na šlechtění pro určité obsahové vlastnosti, jak již bylo uvedeno v rešeršní části. Třetí skupina zahrnuje české odrůdy, materiál pro AI a CMS. A poslední „směsný“ klastr obsahuje odrůdy pocházející z celého světa a různého roku registrace.

V případě analýz, kdy bylo možné hodnotit české a čínské odrůdy, došlo k jednoznačnému rozdělení na dvě skupiny. Tento trend může být opět způsobený použitím naprosto odlišných rodičovských komponent.

Na základě těchto hodnocení byl pro další rutinní využití vybrán ISSR marker, který není tak technicky náročný a má dobrý stupeň polymorfismu. Tato metoda je na našem pracovišti standardně využívána pro hodnocení genetické diverzity nových odrůd či nových rodičovských komponent. V těchto analýzách je využíváno 5-ti ISSR primerů a dochází tedy k navýšení stupně polymorfismu. Výstupem těchto analýz jsou matice podobnosti, na jejímž základě jsou šlechtitelé vybírány nejvhodnější rodičovské komponenty, které vykazují navzájem nejvýraznější rozdíly – jsou si na základě hodnocení nejméně podobné. Díky tomuto nedochází k „náhodnému“ křížení, a tím

pádem dochází opět k úspoře šlechtitelských ploch a času. Výsledky těchto analýz byly publikovány v člancích: „Využití molekulárních markerů pro hodnocení diverzity genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.)“; „Využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky – možnosti a perspektivy“; „Molekulární přístup k hodnocení genetických zdrojů řepky“; „Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů řepky jako podklad pro výběr rodičovských komponent pro křížení“.

Po víceletém pozorování genetické diverzity za použití ISSR markeru jsme došli k pozitivnímu poznatku v tom směru, že v českém novošlechtění dochází k postupnému rozšiřování genetické diverzity.

Tabulka 2 Porovnání metod využívaných pro hodnocení genetické diverzity odrůd řepky

	Pracnost	Finanční náročnost	Opakovatelnost	Počet ampliconů (cca)	Potřeba znalosti sekvence genomu
SSR	méně náročné	vysoká	dobrá	5-10	ano
ISSR	nenáročné	nízká	velmi dobrá	5-30	ne
AFLP	velmi náročné	velmi vysoká	dobrá	50-400	ne

5 Publikace č.1

Marker assisted selection as a tool for detection of *Brassica napus* plants carrying self-incompatibility alleles, in hybrid breeding programs

autoři:

Jana Žaludová, Lenka Havlíčková, Eva Jozová, Vratislav Kučera, Miroslava Vyvadilová, Miroslav Klíma, Vladislav Čurn

publikováno v:

Romain agricultural research

ročník 30, 2013

strana: 13-22

MARKER ASSISTED SELECTION AS A TOOL FOR DETECTION OF *BRASSICA NAPUS* PLANTS CARRYING SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES, IN HYBRID BREEDING PROGRAMS

Jana Žaludová¹, Lenka Havlíčková^{1*}, Eva Jozová¹, Vratislav Kučera²,
Miroslava Vyvadilová², Miroslav Klíma², Vladislav Čurn¹

¹Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Studentská 13,
České Budějovice, Czech Republic

²Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Czech Republic

*Corresponding author. E-mail: lenk@post.cz

ABSTRACT

Self-incompatibility (SI) is one of the most important pollination systems for hybrid seed production in *Brassica napus*. In this study we performed molecular analysis of the *S* locus related genes to understand function of the male and female *S* determinants of SI plants. Specific molecular markers were used for detection of SC/SI plants in current breeding program. We studied three genes for their structure, function, role in SI reaction and dominance relationships, having effect on self-incompatibility expression in plant phenotype with the aim to find effective molecular markers for selection of SI plants to accelerate hybrid breeding process. Molecular markers based on analysis of *SLG I, II, SCR I* and *SRK I* can be successfully used for selection of SI plants and undesirable SC plants are eliminated at early ontogenetic stage from breeding population. Additionally comparative analysis of all of these molecular markers for individual genes can achieve successful selection of functional carriers of recessive *S* alleles during breeding programmes.

Key words: *Brassica napus*, self-incompatibility, *S* locus, *SLG*, *SRK*, *SCR*.

INTRODUCTION

Many modern plant breeding programmes are focused on production of elite F₁ hybrid cultivars. In self-pollinating plants such programmes encounter limitations to overcome and prevent pollination by own pollen and hybrid breeding is using different approaches to protect maternal plants from self-pollination. Self-incompatibility (SI) system is successfully used for the seed production of F₁ hybrid cultivars of *Brassica napus*. In comparison with cytoplasmic male sterility (CMS), SI hybrids have higher F₁ seed production without obvious negative cytoplasm effect and an abundance of restorers (Fu et al., 1975). SI prevents self-fertilization by rejecting pollen from plants with the same genotype. The specificity of pollen-stigma interaction in self-incompatibility system is controlled sporophytically by multiple alleles of a single Mendelian polymorphic locus, designated as the *S* locus (Bateman, 1955). Two female

determinants, *SLG* and *SRK*, located at the *S* locus are involved in the SI plant response. A *SLG* gene (*S* locus glycoprotein) encoding SLGs by respective *S* alleles accumulated in the mature papilla cell wall, where the inhibition of self-pollen tube development occurs (Kishi-Nishizawa et al., 1990). The SLGs consisted of a cleavable signal peptide, several *N*-glycosylation sites, three hypervariable regions, and twelve conserved cysteine residues towards the C-terminus (Watanabe et al., 2003). Gain-of-function experiments have demonstrated that *SLG* enhances the recognition reaction of SI. The coding region of second *S*-linked gene *S* receptor kinase gene, *SRK* (Stein et al., 1991) is 2.6 kb in length and is divided by six introns (Sato et al., 2002). The expression of *SRK* was specifically detected in stigma tissues (Watanabe et al., 1994). Loss of the function of *SRK* was found to result in breakdown of SI (Goring et al., 1993). Extracellular *S* domain sequences of *SRK* alleles are similar to *SLG* sequences of the

same class (Cabrillac et al., 1999) and contains 12 cysteine residues found in all members of the S-gene family in the *Brassicaceae*. This domain is connected via a single pass transmembrane domain to a protein kinase catalytic center. Analysis of *SRK* gene suggests that it encodes an integral membrane protein (~98 kD). The S domain plus 9 residues encoded by exon 2 would be located extracellularly, and the putative kinase domain and flanking regions would be oriented toward the cytoplasm. Of 10 potential N glycosylation sites, 7 would occur extracellularly (Stein et al., 1991). This structure supposes existence of receptors with possible serin/threonin kinase specificity (Nasrallah, 1997). The interaction between the S domain of *SRK* and *SCR/SP11* gene is expected to trigger a phosphorylation cascade in the papilla cell that leads to the rejection of self-pollen.

An anther-specific gene *SCR/SP11* encodes a small cysteine-rich basic protein. The sequence of *SCR/SP11* contains six completely conserved cystein residues which could be important for the tertiary structure of *SCR/SP11*. Pollination bioassay and gain-of-function experiments have indicated that *SCR/SP11* is the male S determinant. Recent biochemical analysis has suggested that *SCR/SP11* operates as a sole ligand to activate its cognate SRK specifically (Watanabe et al., 2003). Because the activity of the S allele is controlled sporophytically, dominance relationships influence the ultimate phenotype of both the stigma and pollen. Molecular analysis has demonstrated that the dominance relationships between S alleles in the stigma were determined by SRK itself, but not by the relative expression level. In contrast, in the pollen, the expression of *SCR/SP11* from the recessive S allele was specifically suppressed in the S heterozygote, suggesting that the dominance relationships in pollen were determined by the expression level of *SCR/SP11* (Watanabe et al., 2003).

Because the S locus consists of genes encoding both female and male S determinants within one segregational unit, and each gene comes in many versions, or alleles produces a different version of the

same protein, different S allele combination of these genes are referred to as S haplotypes. S haplotypes have been classified into two groups, class I, which has been described as having high activity, showed phenotypically strong self-incompatibility characteristics in both the stigma and pollen, while class II demonstrated weak activity and was recessive to other alleles in the pollen (Thompson and Taylor, 1966). Most *B. napus* cultivars contain a class I S haplotype (similar to S^{47} of *B. rapa*) on the A genome and a class II (similar to S^{15} of *B. oleracea*) on the C genome (Okamoto et al., 2007; Zhang et al., 2008). Self-compatibility in *B. napus* is caused by independent mutations in dominant S haplotypes, which result in suppressing the functional recessive S haplotype on different chromosomes (Okamoto et al., 2007). As was described previously, the key determinants of SI system are the pollen-specific *SCR/SP11* protein and its receptor, the pistil-specific SRK protein. Only proteins encoded by matching alleles from each S haplotype can interact (for example, *SCR/SP11*₁ can bind only to *SRK*₁), thus avoiding unnecessary pollen rejection. Normally, either S haplotype can cause pollen rejection if it is shared by the anther and the pistil; however, there are exceptions to the dominance of one S haplotype, masking the recessive S haplotype (Goring et al., 2010). This dominant-recessive relationship between S haplotypes is supposed to be due to the effect of fourth gene, *SP11 methylation inducer* (*SMI*), which is tightly linked to the gene trio mediating SI and is responsible for this altered trait. The suppression of the pollen-recessive *SP11/SCR* gene correlates with methylation of the *SCR/SP11* promoter sequence through the action of the *SMI*, small non-coding RNA (sRNA) specifically produced in the anther, causing gene silencing. Genetic changes in polyploid (amfidiploid) *B. napus*, due to the possible chromosomal rearrangements (Udall et al., 2005), epigenetic phenomena (Gaeta et al., 2007; Lukens et al., 2006) or by presence of putative suppressor locus controlling of SI via unknown mechanism, altering gene expression and phenotype should be also considered (Ekuere et al., 2004).

JANA ŽALUDOVÁ ET AL.: MARKER ASSISTED SELECTION AS A TOOL FOR DETECTION OF *BRASSICA NAPUS* PLANTS CARRYING SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES, IN HYBRID BREEDING PROGRAMS

The aim of this study was to improve molecular tools for selection of SI/SC plants in early developmental stages and to use this approach based on application of molecular selection in hybrid breeding of oil seed rape.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Seed of the cultivars was obtained directly from the breeding stations Opava and Slapy, Czech Republic. DH lines were regenerated via a microspore embryogenesis procedure from the SI plants with objective to fix SI phenotype and low glucosinolate content at the Research Institute of Crop Production in Prague, Czech Republic.

The segregating population of DH lines was derived from three crosses between SI line AIK 6 and self-compatible (SC) cultivar Rasmus, SI line AIK3 and SC line OP-571/00 and finally SI line AIK6 and SC line OP BN-03. AIK3 and AIK6 are DH lines originated from crosses between a donor of recessive self-incompatibility (naturally self-

incompatible discovered plant of line Tandem) and donor of 00-quality (OP-1051) (Figure 1). 120 plants of segregating population were analyzed for SI/SC phenotype by seed test followed by a comparative analysis using molecular markers for the purpose of genotyping. The major inflorescence and two branches were bagged 3 days before flowering. The bags were tapped gently every two days to ensure sufficient self-pollination. The bags were removed after 3 weeks in order to allow the seeds to develop in a more natural environment. After the seedpods matured, the seeds and flowers produced from each bag were counted for phenotypic expression (number of seeds per siliqua so-called “seed test”; Kučera et al., 1999; Vyvadilová et al., 2008). The seed set by selfing was checked when siliquae were ripen. Plants were considered as SI when average number of seeds per siliqua was ranging from 1 to 10, as partially SI with average from 10 to 30 and completely SC with more than 30 seeds per siliqua.

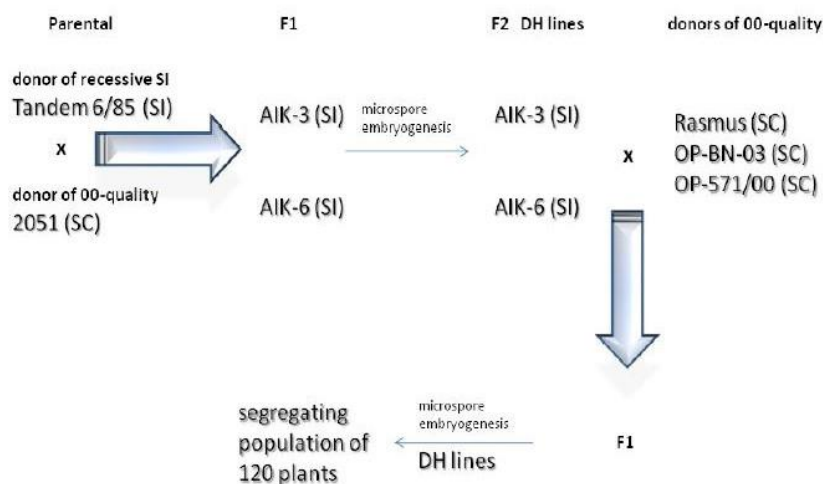


Figure 1. Production of *Brassica napus* doubled haploid lines

**DNA extraction, PCR amplification
DNA isolation and PCR analyses**

Genomic DNA of *B. napus* cultivars and DH lines was extracted from young leaves of

2-week-old seedlings by the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen).

Amplification of specific fragments of *SLG*, *SCR* and *SRK* genes was as following: PCR was performed with 40 ng of genomic

DNA as template, mixed with 0.25 µl (50 µM) of each primer (see Table 1), 12.5 µl SYBR MM (qPCR 2x SYBR Master Mix, TopBio)

and distilled water to make a final volume of 25 µl.

Table 1. Sequences of the *S* locus specific primers

Primer	Nucleotide sequence	Source
SLG		
PS5	5'-ATGAAAGGCGTAAGAAAAACCTA-3'	Nishio et al., 1996
PS15	5'-CCGTGTTTTATTTAAGAGAAAGAGCT-3'	Nishio et al., 1996
PS3	5'-ATGAAAGGGGTACAGAACAT-3'	Nishio et al., 1996
PS21	5'-CTCAAGTCCCACTGCTGCGGG-3'	Nishio et al., 1996
SCR		
2a	5'-TTGGACTTTGACATATGTTTC-3'	Žaludová et al., 2007
2b	5'-CTCTGAAGTGGGTTTACAG-3'	Žaludová et al., 2007
F	5'-GCGAAAATCTTATATACTCATAAG-3'	Shiba et al., 2002
R	5'-TTCGTTGATCAATTATGATT-3'	Shiba et al., 2002
SRK		
PK1	5'-CTGCTGATCATGTTCTGCCTCTGG-3'	Nishio et al., 1997
PK4	5'-CAATCCCAAAATCCGAGATCT-3'	Nishio et al., 1997

PCR reaction with class I *SLG*-specific primers PS5 and PS15 (Nishio et al., 1996) involved pre-denaturation for 5 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 93°C, 2 min at 58°C and 3 min at 72°C, finally, 10 min at 72°C. The PCR condition for *SLG* II gene was performed as described Nishio et al. (1996). The genomic structures of *SCR* gene class II were determined by using a set of primers designed from the 5' and 3' ends of the coding region of *SRK*₆₀ (Shiba et al., 2002). The PCR conditions were 45 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C. These primers were also used for amplification of cDNA under following RT-PCR conditions: 42 cycles of 93°C for 30 s, 45°C for 30 s, 72°C for 1 min and one cycle of 72°C for 5 min resulting in ~350 bp fragment which was cloned, sequenced and used for primer designing (2a and 2b primers) as described below. Targeted allele specific *SCR* II gene primers 2a and 2b for functional allele originating from SI line Tandem (*SCR*II-Tandem 2CB allele; Žaludová, 2007) were designed. PCR involved 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s 60°C and 1 min at 72°C.

SRK gene was amplified with class I *SRK*-specific primers; forward primer PK1 having the nucleotide sequence of the second exon of *S*⁶ *SRK* and a reverse primer PK4

having the nucleotide sequence complementary to the fifth exon of *S*⁶ *SRK* and PCR was performed as described by Nishio et al. (1997). All of PCR products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1 × TBE buffer, and detected by staining with ethidium bromide.

mRNA isolation and cDNA synthesis

Anthers of the doubled haploid SI lines were collected from buds at 2 to 3 days before opening. Total RNA was isolated using RNasy Plant Mini Kit (Qiagen). Isolation included DNA degradation step using DNase. The mRNA was isolated from total RNA using Oligotex mRNA Kit (Qiagen). Approximately 20 µg of RNA was subjected first-strand cDNA synthesis using Omniscript (Qiagen) with an oligo(dT)₁₈ primer. Second strand was amplified with a set of *SCR* II specific primers (Shiba et al., 2002).

Cloning and sequencing of class II *SCR* gene

The fragments obtained by RT-PCR with *SCR* II specific primers (Shiba et al., 2002) were extracted from gel with QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and ligated using TOPO TA Cloning kit (Invitrogen). For plasmid DNA extraction from bacterial cell

JANA ŽALUDOVÁ ET AL.: MARKER ASSISTED SELECTION AS A TOOL FOR DETECTION OF *BRASSICA NAPUS* PLANTS CARRYING SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES, IN HYBRID BREEDING PROGRAMS

suspension was Plasmid Miniprep kit (Qiagen) used. Plasmid were digested with *EcoR* I to confirm inserts size and individual target clones were subsequently sequenced by using a ABI PRISM 310 sequencer.

RESULTS

Three genes were used as molecular markers for selection of self-incompatible plants. Each gene was used for a different strategy aiming to detect SI/SC plant. PCR with class I *SLG*-specific primers has resulted in approximately expected 1300 bp fragment (Figure 2). The nucleotide sequence of PS5 was taken from the 5' terminal region of the open reading frame of the *S*⁸ *SLG* in *B. rapa* (Dwyer et al., 1991). The nucleotide sequence of PS15 was taken from 3' untranslated region of the *S*⁶ *SLG* in *B. oleracea* and shows high similarity to the *S*⁸ *SLG* in *B. rapa* in the corresponding region with only one nucleotide difference at the point near the 5' end (Nishio et al., 1996). Molecular marker was detected in all SC donors of 00 quality, whereas it was not present in SI donors, suggesting that AIK3 and AIK6 contained a class II *S* haplotypes and no class I *S* haplotype. The data confirmed that this fragment was specifically present in plants considered to be self-compatible. *SLG* I gene was then subsequently used for screening of 120 DH lines and its expression was compared with expression of phenotype which was characterised by seed test. 82 (78.8%) of

104 plants with a clear phenotypic expression for SC/SI trait corresponded with *SLG* I gene molecular marker and for the rest of 22 (21.2%) plants detection by this marker was unsuccessful (Figure 2). However these results support the possibility of using *SLG* I gene as useful selective marker, which can be used for first-step based selection of potential breeding material, with the aim to reduce number of plants for following experiments. Screening with specific primers to the class-II *SLGs* resulted in amplification of single DNA fragment having expected size approximately 1.0 kb. The fragment was detected in the SI homozygous lines negative to class-I *SLG* primers, confirming their expected class II/II type. It is assumed, that self-incompatibility in *B. napus* is caused by independent mutations in dominant *S* haplotypes, which result in suppressing the functional recessive *S* haplotype on different chromosomes (Okamoto et al., 2007). Amplicons of *SLG* II gene detected in donor plants of 00-quality used for second cycle of crossing indicating, that these donors have both class I and class II *S* haplotypes except of one plant (2051), used in first cycle of crossing, where ~1.3 kb DNA fragment was amplified. As in the case of Nishio et al. (1996), this plant was inferred to be *SLR2*. These results are in accordance with deduction that in most SC *B. napus* cultivars, the class I *S* haplotype is derived from *B. rapa* *S*⁴⁷, and the class II *S* haplotype from *B. oleracea* *S*¹⁵.

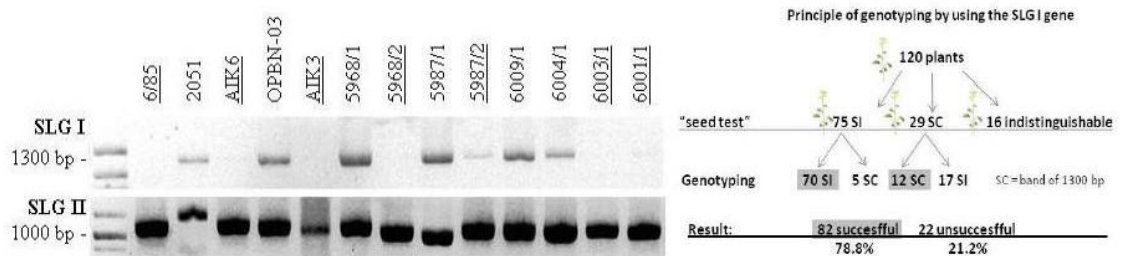


Figure 2. Amplification of class I *SLG* gene. PCR with class I *SLG*-specific primers (PS5 and PS15) has resulted in approximately 1300 bp fragment which are specifically present in plants considered to be self-compatible (SC). This molecular marker reported greater than 78% of successful detection of SI/SC genotype in 104 tested DH lines. PCR with specific primers to the class-II *SLGs* resulted in amplification of single DNA fragment having expected size approximately 1.0 kb in all plants (except of the samples 2051), detecting the presence of recessive *S* haplotype and causing inability to use this marker system for SI/SC detection. Self-incompatible plants are underlined.

Second marker system was based on the use of functional allele of essential gene in SI reaction and this approach was specifically targeted on alleles of class II *SCR* gene. PCR using *SCR* II primers (Shiba et al., 2002) designed from coding region of *SRK60* resulted in 450bp amplicons which were present in all tested plants and did not lead to successful differentiation of SC/SI plants. These primers were subsequently used for RT-PCR analysis from anthers of plants with clear SI/SC genotype. This analysis revealed, that this genomic region is expressed as 326 bp fragment in anther tissue and produces a secreted cysteine-rich small basic protein, as shown in Figure 3. Alignment of obtained sequences led to the discovery of the presence of two different specific alleles for SC and SI genotype of *SCR* II gene. The sequence similarity between these two alleles was 95% and comparison with database NCBI showed for both SC/SI sequences 99 and 95% identity with *Brassica rapa* S⁶⁰-SP11 haplotype respectively, but in case of SC sequence 99% identity was also observed for *B. oleracea* S¹⁵-SP11 haplotype. This could suggest that recessive class II *S* haplotype of SI plants originates from *A* genome of *B. rapa* and for SC plants due to the large similarity especially

in sequence for primers may come from *C* genome of *B. oleracea*.

According to the evolutionary model of *Brassica* SI proposed by Uyenoyama (2000) a low survival rate of a newly arisen mutation and less divergence among alleles in class II *SCR*/SP11 than in class I was predicted. The amino acid sequence of the S⁶⁰-SP11 (the GenBank accession number S⁶⁰-SP11: AB067446) and SC sequence were found to be almost similar (F amino acid instead of I), whereas SI sequence showed some highly variable amino acid residues, suggesting that these sites are targets of the selection and are probably functionally important for SI determination. Unlike SC sequence, where was the change in one amino acid present in the *SCR* coding region, for SI sequence these changes cover also signal peptide and transmembrane region (Figure 3). Across all the differences in amino acids of both sequences (SC and SI), they still contain eight cysteine residues, a glycine residue between C1 and C2 and an aromatic residue between C3 and C4 that are conserved. However for both SI/SC sequences unlike of the present signal peptide and transmembrane region no matches for the present *SCR* gene were found in the InterPro Scan database.

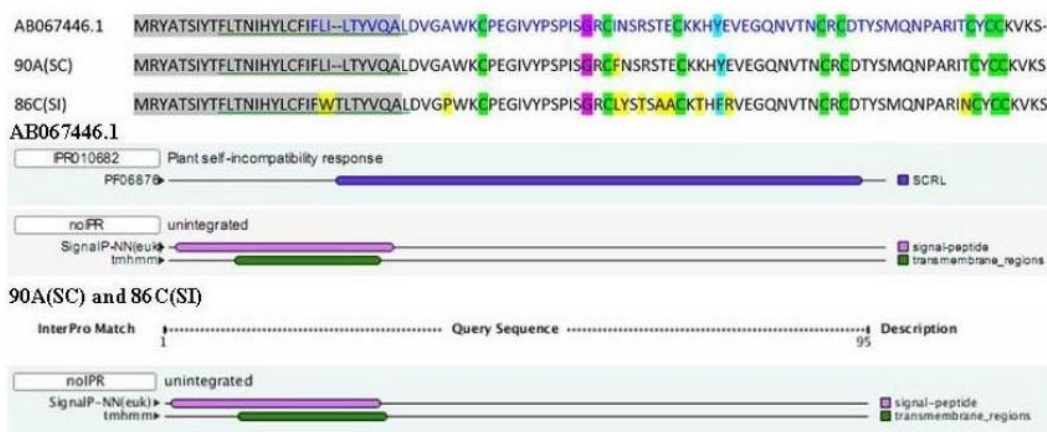


Figure 3. Alignment of the predicted amino acid sequences of three allelic variants of class II *SP11* composed of signal peptide (gray boxes), transmembrane domain (underlined letters) and *SCR* gene region (blue letters). Gaps (hyphens) were introduced to optimize the alignment. Conserved amino acid residues, eight cysteine residues (C1 to C8 in green boxes), a glycine residue (purple boxes), and aromatic amino acid residue (blue boxes) are marked. Mutations of single alleles are highlighted with yellow boxes (InterProScan, version 4.8; European Bioinformatic Institute).

JANA ŽALUDOVÁ ET AL.: MARKER ASSISTED SELECTION AS A TOOL FOR DETECTION OF *BRASSICA NAPUS* PLANTS CARRYING SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES, IN HYBRID BREEDING PROGRAMS

From this two particular alleles obtained from SI/SC plants, allele-specific primers in their variable region have been derived (2a and 2b, Žaludová, 2007).

These primers were used for screening of segregating population and a single ~ 280 bp band was obtained in SI plants only (Figure 4). The amplicon has a 149 bp long intron between the transmembrane domain and a protein kinase catalytic center. A sequence analysis of the RT-PCR product revealed that the intron is precisely spliced out at the same position as it is in other *SCR* alleles, such as in the case of 90 bp intron of *S*₆₀-SP11 presented in study of Shiba (2002).



Figure 4. PCR screening of segregating population with allele-specific primers (2a and 2b, Žaludová, 2007) led to amplification of a single ~ 280 bp band present in SI plants only. Self-incompatible plants are underlined.

Third marker system was focused on analysis of *SRK* gene. Primer pair PK1 and PK4 was used for amplification of polymorphic DNA fragments from *SRK* gene of many *S* haplotypes class I. PCR reaction using this primer pair gave a single DNA fragment approximately 950 bp detecting all SI plants (Figure 5), as in the case of class I *SLG* specific primers.

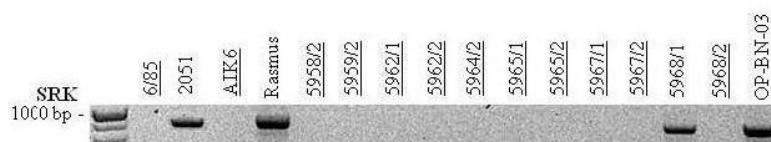


Figure 5. Amplification of *SRK* gene by using PK1 and PK4 primers. DNA fragments ~ 950 bp detected self-compatible plants. Self-incompatible plants are underlined.

The inability to amplify class-II *SRK* may be due to either homology with the primer sequences at the corresponding sites, or to the long first or the third intron (Tantikanjana et al., 1993; Zhang et al., 2008). This marker detected plants with dominant *S*

haplotype which suppresses the functional recessive *S* haplotype.

Comparison of selection success of these three molecular markers and summary of length and presence of amplified bands are given in table 2.

Table 2. Three molecular markers in (Tandem × 2051) AIK3 and AIK6 derived F₂ DH population and (AIK3 × OP-771-00; AIK6 × Rasmus; AIK6 × OP-BN-03) F₂ DH population. The numbers represent amount of the plants discriminated by using these primers

	Length of PCR product				genotyping of segregating population		
	Tandem		F ₂		F ₂		
phenotype	SI	SC	AIK3 AIK6	Rasmus OP-BN-03 OP-571/00	SC	SI	indifferent
SLGI (PS5/PS15)	-	1300 bp	-	1300 bp	12 (29*)	5 (75*)	(16*)
SCR II (2a/2b)	280 bp	-	280 bp	-	- (29*)	75 (75*)	(16*)
SRK I (PK1/PK4)		950 bp		950 bp	12 (29*)	5 (75*)	(16*)

*The number plants classified by seed test

DISCUSSION

Specific primers PS5/PS15, described as a class I *SLG* (Nishio et al., 1996), co-

segregated with SC phenotype, whereas no amplicon was obtained in recessive type of SI plants. These results corresponded with the results of some other studies (Dolanská and

Čurn, 2004; Zhang et al., 2008). Even if the *SLG* gene is believed to enhance the SI phenotype by stabilizing SRK (Dixit et al., 2000; Takasaki et al., 2000), it was proved, that SLG is estimated not to be necessary for self-recognition (Kusaba and Nishio 1999; Suzuki et al., 2000). Several reports show that *SLG* was mutated or deleted in some *S* haplotypes of self-incompatible *B. oleracea* (Okazaki et al., 1999; Suzuki et al., 2000) or *B. rapa* (Suzuki et al., 2003). However, the *S* haplotypes lacking *SLG* are a minority in *Brassica*.

If SLG functions as a stabilizer of the SRK-SP11 complex, one of the possible explanations of the normal SI phenotype of SI plants is replacement of *SLG* I gene in form of observed recessive form of *SLG* II gene with its proper function, or the existence of a substitute for the SLG protein such as eSRK. The regulation of the stable SI phenotype in the SLG-less *S* haplotypes is one of the most interesting unsolved questions that should be clarified in the near future.

The SCR allelic specific marker was developed after analyses of SI line derived from Tandem. This approach was supposed to be more accurate than application of *SLG* marker gene. The amplified fragment corresponding to recessive allele of *SCR/SP11* II gene (280 bp) detected all SI DH plants derived after second cycle of crossing (see Figure 4 and Table 2). For such a selective detection of SI plants allele-specific primers were used and SI plants with “*Tandem SI alleles*” were specifically detected. Due to the finding, that the dominant/recessive relationship between class I and class II *S*-haplotypes in the determination of pollen phenotype is generated at the level of *SCR/SP11* transcription, it is likely, that dominant class I *SCR/SP11* gene does not cause silence of class II *SCR/SP11* gene in studied population probably due to its malfunction, or due to some changes in its regulation. In any case when using SCR allelic specific marker system one should take into account that the allele specific primers were designed on the basis of sequences obtained from specific plant material and, given the *SCR* polymorphic nature, it is evident that

they cannot easily amplify single alleles in different cultivars.

For the specific amplification of *SRK* DNA, primer pair PK1 and PK4 was used. This molecular marker showed the same degree of success as marker for class I *SLG* gene detection. These results confirm the assumption of Nishio et al. (1997) that the tight linkage between *SLG* and *SRK* is hardly ever, or never, broken at meiosis. The low possibility of recombination between *SLG* and *SRK* indicates that selection of SC plants with either *SLG* or *SRK* is adequate for the identification, but genotyping with the second marker system can be used as an additional control of efficiency of selection.

It can be concluded, that the used molecular markers, based on analysis of *SLG* I, II, *SCR* I and *SRK* I, can be successfully used for selection of SI plants and undesirable SC plants can be eliminated at early ontogenetic stage. Additionally comparative analysis of all of these molecular markers for individual genes can achieve successful selection of functional carriers of recessive *S* alleles during breeding programmes. However, further molecular analyses on the function of *S*-locus-related genes are necessary, because several reports show that other unknown factors might be involved in SI response (Tarutani et al., 2010).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support of the National Agency for Agricultural Research grant No. NAZV QII11A075 and University of South Bohemia grant No. GAJU 064/2010/Z.

REFERENCES

- Bateman, A.J., 1955. *Self-incompatibility systems in angiosperms: III. Cruciferae*. Heredity, 9: 53-68. DOI: 10.1038/hdy.1955.2.
- Cabrillac, D., Delorme, V., Garin, J., Ruffio-Châble, Giranton, J.-L., Dumas, C., Gaude, T., Cock, J.M., 1999. *The S15 self-incompatibility haplotype in Brassica oleracea includes three S gene family members expressed in stigmas*. Plant Cell, 11: 971-986. DOI: 10.1105/tpc.11.5.971.
- Dixit, R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B., 2000. *Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase*

JANA ŽALUDOVÁ ET AL.: MARKER ASSISTED SELECTION AS A TOOL FOR DETECTION OF *BRASSICA NAPUS* PLANTS CARRYING SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES, IN HYBRID BREEDING PROGRAMS

- of *Brassica* correlates with co-expression of the *S-locus* glycoprotein in the stigmas of two *Brassica* strains and in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.*, 124: 297-311. DOI: 10.1104/pp.124.1.297.
- Dolanská, L., Čurn, V., 2004. *Analysis of SLG gene – the molecular marker in hybrid breeding of oil seed rape*. *Journal Central European Agriculture*, 5: 23-28.
- Dwyer, K.G., Balent, M.A., Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E., 1991. *DNA sequences of self-incompatibility genes from Brassica campestris and B. oleracea: polymorphism predating speciation*. *Plant Mol. Biol.*, 16: 481-486. DOI: 10.1007/BF00024000.
- Ekure U.U., Parkin I.A., Bowman C., Marshall D., Lydiate D.J., 2004. *Latent S alleles are widespread in cultivated self-compatible Brassica napus*. *Genome*, 47: 257-265. DOI: 10.1139/g03-120.
- Fu, T.D., Liu, H.L., 1975. *Preliminary report on the breeding of self-incompatible lines of Brassica napus*. *Oil Crops China*, 4: 77-85.
- Gaeta R.T., Pires J.C., Iniguez-Luy F., Leon E., Osborn T.C., 2007. *Genomic changes in resynthesized Brassica napus and their effect on gene expression and phenotype*. *Plant Cell*, 19: 3403-3417. DOI: 10.1105/tpc.107.054346.
- Goring, D.R., Galvin, 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: 531-539. DOI: 10.1105/tpc.5.5.531.
- Goring, D., Indriolo, E., 2010. *Gene expression: How plants avoid incest*. *Nature*, 466: 926-928. DOI: 10.1038/466926a.
- Kishi-Nishizawa, N., Isogai, A., Watanabe, M., Hinata, K., Yamakawa, S., Shojima, S., Suzuki, A., 1990. *Ultrastructure of papilla cells in Brassica campestris revealed by liquid helium rapid freezing and substitution-fixation method*. *Plant Cell Physiol.*, 31: 1207-1219.
- Nasrallah, J.B., 1997. *Evolution of the Brassica self-incompatibility locus: A look into S-locus gene polymorphisms*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9516-9519. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9516.
- Kučera, V., Vyvadilová, M., Tomášková, D., 1999. *Development of self-incompatible double low winter oilseed rape lines by means of double haploid system*. *Proceeding of 10th International Rapeseed Congress*. University Canberra, p. 183.
- Kusaba, M., Nishio, T., 1999. *Comparative analysis of S haplotypes with very similar SLG alleles in Brassica rapa and Brassica oleracea*. *Plant J.*, 17: 83-91. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00355.x
- Lukens, L., Pires J.C., Leon E., Vogelzang R.D., Oslach L., Osborn T., 2006. *Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized Brassica napus allopolyploids*. *Plant Physiology*, 140: 336-348. DOI: 10.1104/pp.105.066308.
- Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E., 1993. *Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response*. *Plant Cell*, 5: 1325-1335. DOI: 10.1105/tpc.5.10.1325.
- Nishio, T., Kusaba, M., Sakamoto, K., Ockendon, D.J., 1997. *Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (SRK) in Brassica oleracea L*. *Theor Appl Genet.*, 95: 335-342. DOI: 10.1007/s001220050568.
- 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: 388-394. DOI: 10.1007/BF00223684.
- Okamoto, S., Odashima, M., Fujimoto, R., Sato, Y., Kitashiba, H., Nishio, T., 2007. *Self-compatibility in Brassica napus is caused by independent mutations in S-locus genes*. *Plant J.*, 50: 391-400. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03058.x.
- Okazaki, K., Kusaba, M., Ockendon, D.J., Nishio, T., 1999. *Characterization of S tester lines in Brassica oleracea: polymorphism of restriction fragment length of SLG homologues and isoelectric points of S locus glycoproteins*. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1329-1334. DOI: 10.1007/s001220051199.
- Sato, K., Nishio, T., Kimura, R., Kusaba, M., Suzuki, T., Hatakeyama, K., Ockendon, D.J., Satta, Y., 2002. *Coevolution of the S-locus genes SRK, SLG and SP11/SCR in Brassica oleracea and B. rapa*. *Genetics*, 162: 931-940.
- 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. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02048-2.
- Suzuki, G., Kakizaki, T., Takada, Y., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., 2003. *The S haplotypes lacking SLG in the genome of Brassica rapa*. *Plant Cell Rep.*, 21: 911-915. DOI: 10.1007/s00299-003-0598-5.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, K., Shimosato, 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. DOI: 10.1105/tpc.010378.
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., Nasrallah, J. B., 1991. *Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8816-8820. DOI: 10.1073/pnas.88.19.8816.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K., 2000. *The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma*. *Nature*, 403: 913-916. DOI: 10.1038/35002628.
- Tantikanjana, T., Nasrallah, M.E., Stein, J.C., Chen, C-H., Nasrallah, J.B., 1993. *An alternative transcript of the S-locus glycoprotein gene in a class-II pollen-recessive self-incompatibility haplotype of*

- Brassica oleracea* encodes a membrane-anchored protein. *Plant Cell*, 5: 657-666. DOI: 10.1105/tpc.5.6.657.
- Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S., 2010. *Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility*. *Nature*, 466: 983-986. DOI: 10.1038/nature09308.
- Thompson, K.F., Taylor, J.P., 1966. *Non-linear dominance relationships between S alleles*. *Heredity*, 21: 345-362. DOI: 10.1038/hdy.1966.36.
- Udall, J.A., Quijada, P.A., Osborn, T.C., 2005. *Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of Brassica napus L.* *Genetics*, 169: 967-979. DOI: 10.1534/genetics.104.033209.
- Uyenoyama, M.K., 2000. *Evolutionary dynamics of self-incompatibility alleles in Brassica*. *Genetics*, 156: 351-359.
- Vyvadilová, M., Klíma, M., Kučera, V., 2008. *Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé*. VURV, V.V.I., Praha – Ruzyně: 1-27.
- Watanabe, M., Takayama, S., Isogai, A., Hinata, K., 2003. *Recent progresses on self-incompatibility research in Brassica species*. *Breeding Science*, 53: 199-208. DOI: 10.1270/jsbbs.53.199.
- Watanabe, M., Takasaki, T., Toriyama, K., Yamakawa, S., Isogai, A., Suzuki, A., Hinata, K., 1994. *A high degree of homology exists between the protein encoded by SLG and the S receptor domain encoded by SRK in Brassica campestris L.* *Plant Cell Physiol.*, 35: 1221-1229.
- Zhang, X., Ma, C., Fu, T., Li, Y., Wang, T., Chen, O., Tu, J., Shen, J., 2008. *Development of SCAR markers linked to self-incompatibility in Brassica napus L.* *Mol. Breeding*, 21: 305-315. DOI: 10.1007/s11032-007-9130-x.
- Žaludová, J., 2007. *The structure and the function of the S-locus in oilseed rape (Brassica napus L.)*. Ph.D thesis. JU ZF, České Budějovice.

6 Publikace č.2

Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for identification of the class I S haplotype

autoři:

Lenka Havlíčková, Eva Jozová, Miroslav Klíma, Vratislav Kučera, Vladislav Čurn

publikováno v:

Genetic and Molecular Biology

ročník: 37, 2014

strana: 556-559



Short Communication

Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for identification of the class I S haplotype

Lenka Havlíčková¹, Eva Jozová¹, Miroslav Klíma², Vratislav Kucera² and Vladislav Curn¹

¹Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budejovice, Czech Republic.

²Crop Research Institute, Praha, Czech Republic.

Abstract

The selection of desirable genotypes with recessive characteristics, such as self-incompatible plants, is often difficult or even impossible and represents a crucial barrier in accelerating the breeding process. Molecular approaches and selection based on molecular markers can allow breeders to overcome this limitation. The use of self-incompatibility is an alternative in hybrid breeding of oilseed rape. Unfortunately, stable self-incompatibility is recessive and phenotype-based selection is very difficult and time-consuming. The development of reliable molecular markers for detecting desirable plants with functional self-incompatible genes is of great importance for breeders and allows selection at early stages of plant growth. Because most of these reliable molecular markers are based on discrimination of class I S-locus genes that are present in self-compatible plants, there is a need to use an internal control in order to detect possible PCR inhibition that gives false results during genotyping. In this study, 269 double haploid F₂ oilseed rape plants obtained by microspore embryogenesis were used to verify the applicability of an improved PCR assay based on the detection of the class I *SLG* gene along with an internal control. Comparative analysis of the PCR genotyping results vs. S phenotype analysis confirmed the applicability of this molecular approach in hybrid breeding programs. This approach allows accurate detection of self-incompatible plants via a different amplification profile.

Keywords: double haploid, hybrid breeding, MAS, S locus, *SLG*.

Received: November 21, 2013; Accepted: April 14, 2014.

An efficient pollination control system is necessary in hybrid breeding in order to avoid unwanted self-pollination or sib-pollination of the female parental line. In self-pollinating plants such programs are limited in their ability to overcome and prevent pollination by their own pollen. Consequently, hybrid breeding depends on a variety of approaches to protect maternal plants from self-pollination. Self-incompatibility (SI) prevents self-fertilization by rejecting pollen from plants with the same genotype (Charlesworth, 2010; Goring and Indriolo, 2010) and has been successfully used for seed production in F₁ hybrid cultivars of *Brassica napus* (Zhang *et al.*, 2008a). In *Brassica*, the specificity of pollen-stigma interactions in SI systems is controlled sporophytically by two linked genes with multiple allelic forms (S haplotypes) of a single Mendelian polymorphic locus, designated as the S locus (Bateman, 1955; Nasrallah *et al.*, 1991). The male and female determinants of SI encoded by the S-locus genes have been identified as a peptide ligand (S-locus protein 11; *SP11*, or

S-locus cysteine-rich protein; *SCR*) (Schopfer *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999) and its cognate receptor (S-locus receptor kinase; *SRK*; Stein *et al.*, 1991) respectively. Recognition specificity is achieved by interaction of the female determinant *SRK* with its ligand, the male determinant *SP11* (Chapman and Goring, 2010). The interaction between *SP11* and *SRK* triggers the signaling cascade in an S-haplotype-specific manner and results in the rejection of self-pollen, but the signal components involved are still not well characterized (Zhang *et al.*, 2011). S-locus glycoprotein (SLG) encoded by the *SLG* gene is the second female determinant involved in SI reaction. SLGs accumulate in the mature papilla cell wall and affect self-pollen tube development (Kishi-Nishizawa *et al.*, 1990). Gain-of-function experiments have demonstrated that SLG enhances the recognition reaction of SI (Watanabe *et al.*, 2003).

The S haplotypes are divided into classes I and II (Nasrallah *et al.*, 1991). Class I is generally dominant over class II in pollen and confers a strong SI phenotype (Nasrallah and Nasrallah, 1993). Cultivated *B. napus* (2n = 38, AACC) is a self-compatible allotetraploid that originated through spontaneous interspecific hybridization between two self-incompatible species, *Brassica rapa*

Send correspondence to Lenka Havlíčková. Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Studentská 13, České Budejovice, CZ-370 05, Czech Republic. E-mail address: lenk@post.cz.

($2n = 20$, AA) and *Brassica oleracea* ($2n = 18$, CC). Theoretically, *B. napus* lines are considered to be homozygous at two *S* loci, with one *S* haplotype being derived from *B. rapa* and the other from *B. oleracea*. *Brassica napus* is considered to be self-incompatible like its two ancestors and artificially produced lines, although most cultivated lines are self-compatible (Zhang *et al.*, 2011). Most *B. napus* contain a class I *S* haplotype (similar to S^{47} of *B. rapa*) in the A genome and a class II haplotype (similar to S^{15} of *B. oleracea*) in the C genome (Okamoto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008a). Self-compatibility in *B. napus* is caused by independent mutations in dominant *S* haplotypes that result in suppression of the functional recessive *S* haplotype on different chromosomes (Okamoto *et al.*, 2007). Four and three class-II *S* haplotypes have been identified in *B. rapa* (S^{29} , S^{40} , S^{44} , S^{60}) and *B. oleracea* (S^2 , S^5 , S^{15}) (Sato *et al.*, 2006). Not surprisingly, in homozygous plants with two recessive *S* haplotypes, the character of the recessive *S* haplotype appears as an SI phenotype that is usually a mutant phenotype. However, genetic changes in polyploid *B. napus*, including chromosomal rearrangements (Udall *et al.*, 2005) and epigenetic phenomena (Gaeta *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011), can alter gene expression and phenotype. No original Czech hybrid cultivar based on SI has yet been released, but SI is currently intensively used in Czech breeding programs. An approach based on molecular marker technology for the genotyping of breeding populations in rapeseed hybrid breeding could provide a greater incentive for investment.

A double haploid (DH) SI line (SI20) with stable recessive *S* haplotypes derived from crosses between an SI donor line (WRG15) and self-compatible donors of 00-quality (2051; Viking) and four self-compatible (SC) cultivars (Da Vinci, Cabernet, Chagall and Wisent) were used in this study (Figure 1). Four SC cultivars were used as

the male parent in crosses with the SI20 line to obtain F_1 hybrids, and the F_1 plants were used to produce 269 DH of the F_2 population via microspore embryogenesis. These populations are regularly created by breeders to improve the properties of self-incompatible plants and obtain desirable genotypes of comparable or excess properties equal to current best cultivars. The variation of newly created DH plants reflects primarily in additive gene effects and additive epistasis, enabling fixation in only one cycle of selection compared to about seven years using the conventional system to generate near homozygous lines. All of the materials used in this study were obtained from the Research Institute of Crop Production in Prague, Czech Republic.

The *S* phenotype was measured as follows: when the first flowers appeared on the major inflorescence, this inflorescence and two secondary ramifications were bagged for self-pollination. Every two days, the bags were tapped gently to ensure enough self-pollination. The bags were removed after three weeks to allow the seeds to develop in a more natural environment. After maturation of the seed siliques, the number of seeds produced was counted. The seed set obtained by selfing was checked when siliques were ripe. Plants were considered as SI when the number of seeds per silique ranged from 0 to 3. Self-seeds were obtained by bud-pollination when the SI reaction was still not fully developed.

Genomic DNA from *B. napus* cultivars and the DH line was extracted from young leaves using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Williams *et al.*, 1992). The concentration and quality of DNA was determined with a BioMate 5 spectrophotometer. PCR amplification was done using a primer pair SLG α (Zhang *et al.*, 2008b) developed from SLG-A10 and that amplified a ~1100 bp region in SC plants but not in the SI line. The primer pair SCO3 that amplified a ~750 bp fragment (Zeng

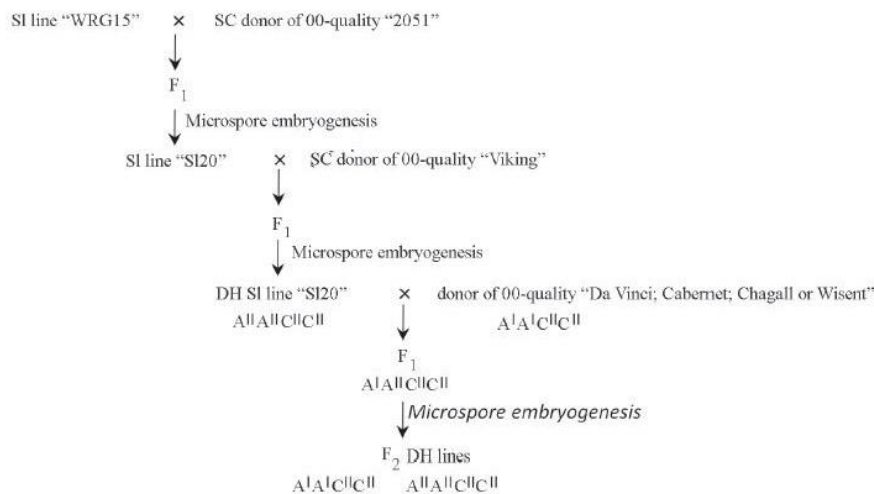


Figure 1 - Overview of the triple-cross model, including the three-component hybrid and three line hybrid in *B. napus*.

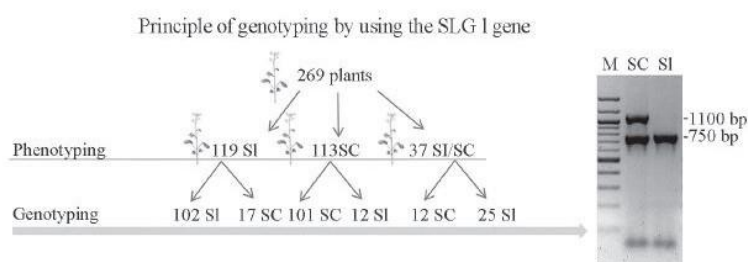


Figure 2 - Phenotypic and genotypic screening of F_2 DH plants. The plants ($n = 269$) initially underwent S phenotypic analysis followed by genotyping with molecular markers. Duplex PCR with class I SLG-specific primers (SLG α forward and reverse) resulted in the amplification of an ~1.1 kb fragment in plants considered to be self-compatible (SC); self-incompatible (SI) plants showed no such fragment. All samples (SC and SI) showed amplification of a 750-bp internal control fragment. M – molecular markers.

et al., 2009) was used as a positive control for the presence of DNA in the PCR. PCR was done with 10 ng of genomic DNA as template, mixed with 0.5 μ L (10 μ M) of each primer, 10 μ L of PPP master mix (TopBio), 1x BSA and distilled water to give a final volume of 20 μ L. The PCR reaction involved pre-denaturation for 3 min at 95 $^{\circ}$ C followed by 35 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 58 $^{\circ}$ C and 1 min at 72 $^{\circ}$ C and finally, 10 min at 72 $^{\circ}$ C. The PCR products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels in 1x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and detected by staining with ethidium bromide.

All SI20 x (SC) Da Vinci, Cabernet, Chagall and Wisent F_1 plants were completely self-compatible, indicating that the S haplotype of the A genome of SI20 was recessive ($A^{\text{II}}A^{\text{II}}C^{\text{II}}C^{\text{II}}$) to four SC cultivars deduced to be $A^{\text{I}}A^{\text{I}}C^{\text{II}}C^{\text{II}}$. Self-incompatibility was assessed in the F_2 DH population of 269 plants. The distribution of the S phenotype showed two distinct classes, with a score < 3 indicating SI plants ($n = 119$) and > 10 indicating SC plants ($n = 113$). Limited number of plants ($n = 37$) showed intermediate character with score 4-10 indicating SI/SC plants. The segregation of SC plants to SI plants in the F_2 DH population at the molecular level agreed with the expected ratio of 1:1 (130 SC vs. 139 SI) for a single S locus (Figure 2).

An approach based on molecular markers was implemented in a traditional schedule of oilseed rape hybrid breeding. A particular technique that involved two pairs of primers was used to manage the breeding population. Comparison of the genotype (presence of the desired alleles) vs. phenotype (seed test) showed that selection based only on phenotypic expression (number of seeds per silique) can lead to the loss of valuable SI genotypes (in our case, with improper selection 4.5% of the plants ($n = 12$) would be excluded, as well as a further 37 phenotypically indistinguishable flowers, if there were no subsequent molecular characterization). In 12 plants phenotypically identified as SC we assumed that there was breakdown of the SI barrier at the end of flowering, possibly as a result of survival strategies. The 17 plants that showed the SI phenotype (contrary to their SC genotype) could have been caused by high tem-

peratures in the pollination bags that, together with humidity, can lead to complete sterility (Shah *et al.*, 2011) or induce the loss of siliques in the early stages of development, as described by Young *et al.* (2004). The presence of haploid plants can also cause the SI phenotype.

Recent molecular screening for the class I S haplotype has been based on the detection of SLG I/SRK I genes (Gao *et al.*, 2013), and gene transformation studies have confirmed that both of these genes are important for the SI recognition reaction (Watanabe *et al.*, 2012). Self-incompatibility mechanisms associated with functional molecular markers can be particularly important in hybrid breeding, as suggested by Tochigi *et al.* (2011). These authors showed that the use of a molecular marker based selection of SI plants leads to elimination of undesirable SC plants at an early ontogenetic stage and to favourable reduction of the number of plants available for subsequent experiments. In conclusion, the results of this study indicate that we have successfully developed and validated a new approach for detecting SI.

Acknowledgments

This research was supported by projects QII11A075, GAJU 063/2013/Z and project Postdoc USB no. CZ.1.07/2.3.00/30.0006. We thank Dr. E.A. Merkulova for reading the manuscript and helpful comments.

References

- Bateman AJ (1955) Self-incompatibility systems in angiosperms: III, Cruciferae. *Heredity* 9:52-58.
- Chapman LA and Goring DR (2010) Pollen-pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae. *J Exp Bot* 61:1987-1999.
- Charlesworth D (2010) Self-incompatibility. *Biol Rep* 2:68.
- Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E and Osborn TC (2007) Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* 19:3403-3417.
- Gao C, Ma C, Zhang X, Li F, Zhang J, Zhai W, Wang Y, Tu J, Shen J and Fu T (2013) The genetic characterization of

- self-incompatibility in a *Brassica napus* line with promising breeding potential. *Mol Breed* 31:485-493.
- Goring D and Indriolo E (2010) How plants avoid incest. *Nature* 466:296-928.
- Kishi-Nishizawa N, Isogai A, Watanabe M, Hinata K, Yamakawa S, Shojima S and Suzuki A (1990) Ultrastructure of papilla cells in *Brassica campestris* revealed by liquid helium rapid freezing and substitution-fixation method. *Plant Cell Physiol* 31:1207-1219.
- Nasrallah JB and Nasrallah ME (1993) Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5:1325-1335.
- Nasrallah JB, Nishio T and Nasrallah ME (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.
- Okamoto S, Odashima M, Fujimoto R, Sato Y, Kitashiba H and Nishio T (2007) Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in *S*-locus genes. *Plant J* 50:391-400.
- Sato Y, Sato K and Nishio T (2006) Interspecific pairs of class II *S* haplotypes having different recognition specificities between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol* 47:340-345.
- Schopfer CR, Nasrallah ME and Nasrallah JB (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286:1697-1700.
- Shah F, Huang J, Cui K, Nie L, Shah T, Chen C and Wang K (2011) Impact of high-temperature stress on rice plant and its traits related to tolerance. *J Agr Sci* 149:545-556.
- Stein JC, Howlett B, Boyes DC, Nasrallah ME and Nasrallah JB (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8816-8820.
- Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukai K, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M and Hinata K (1999) Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*(9) haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153:391-400.
- Tochigi T, Udagawa H, Li F, Kitashiba H and Nishio T (2011) The self-compatibility mechanism in *Brassica napus* L. is applicable to F1 hybrid breeding. *Theor Appl Genet* 123:475-482.
- Udall JA, Quijada PA and Osborn TC (2005) Detection of chromosomal rearrangements derived from homologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* 169:967-979.
- Watanabe M, Takayama S, Isogai A and Hinata K (2003) Recent progresses on self-incompatibility research in *Brassica* species. *Breed Sci* 53:199-208.
- Watanabe M, Suwabe K and Suzuki G (2012) Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility in Brassicaceae. *Proc Jpn Acad Ser B* 88:519-535.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA and Tingey SV (1992) Genetics analysis using RAPD markers. *Methods Enzymol* 260:335-348.
- Young LW, Wilen RW and Bonham-Smith PC (2004) High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *J Exp Bot* 55:485-495.
- Zeng F, Yi B, Tu J and Fu T (2009) Identification of AFLP and SCAR markers linked to the male fertility restorer gene of *pol* CMS (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 165:363-369.
- Zhang X, Ma C, Tang J, Tang W, Tu J, Shen J and Fu T (2008a) Distribution of *S* haplotypes and its relationship with restorer-maintainers of self-incompatibility in cultivated *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 117:171-179.
- Zhang X, Ma C, Fu T, Li Y, Wang T, Chen O, Tu J and Shen J (2008b) Development of SCAR markers linked to self-incompatibility in *Brassica napus* L. *Mol Breed* 21:305-315.
- Zhang X, Yin D, Zhu W, Ma C and Fu T (2011) Progress on characterization of self-incompatibility in *Brassica napus* L. *Euphytica* 182:147-155.

Associate Editor: Dario Grattapaglia

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

7 Publikace č.3

Genetic diversity Assesment in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus L.*) Collection Using AFLP, ISSR and SSR Markers

autoři:

Lenka Havlíčková, Eva Jozová, Andrea Rychlá, Miroslav Klíma, Vratislav Kučera,
Vladislav Čurn

publikováno v:

Czech J. Genet. Plant Breed.

ročník: 50, 2014

strana: 216-225

Genetic Diversity Assessment in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Collection Using AFLP, ISSR and SSR Markers

LENKA HAVLÍČKOVÁ¹, EVA JOZOVÁ¹, ANDREA RYCHLÁ², MIROSLAV KLÍMA³,
VRATISLAV KUČERA³ and VLADISLAV ČURN¹

¹Biotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic; ²Research Institute of Oilseed Crops, Opava, Czech Republic; ³Crop Research Institute, Prague-Ruzyně, Czech Republic

Abstract

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.

The genetic diversity of 94 accessions of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.), representing past and contemporary material utilized in the Czech breeding programmes, was determined using microsatellites (SSRs), ISSRs and AFLPs. All three kinds of markers differed in the range of observed polymorphism and differentiated clearly each accession. Altogether 89 SSR, 1003 AFLP and 53 ISSR markers were evaluated. Their average rates of polymorphic bands were 100%, 53.9% and 90.6%, respectively, indicating high genetic diversity among the accessions. The greatest genetic distance was found by ISSRs (62.3%) whereas significantly lower distances of 49.4% in SSRs and 35.5% in AFLPs were observed. The genetic similarity matrix clearly distinguished all accessions. A set of the most distinct varieties was established. The analysis of the genetic pattern of the accessions indicated two groups comprising most of the modern Czech breeding materials, revealing a distinct shift in breeding. Surprisingly, molecular analyses did not support breeders' views about a narrow genetic base of the Czech breeding materials. The choice of appropriate technology for different aspects of germplasm evaluation is also discussed.

Keywords: *Brassica napus*; genetic distances; genetic diversity; molecular markers

The genetic base of oilseed rape (*Brassica napus*) is quite narrow due to its limited geographic range and intensive breeding (GIRKE *et al.* 2012). Research on *Brassica* germplasm and evaluation of its genetic diversity could accelerate the efficient use of genetic variation through establishing a breeding programme (STOKES *et al.* 2010; HARPER *et al.* 2012). Heterosis in hybrids is based on genetic completion between divergent parents, so the information on genetic diversity could help breeders better understand the genetic structure of germplasm and to predict which cross combinations would produce good F₁ hybrids (Yu *et al.* 2007). Breeders currently choose components for hybrid combinations based on desirable

characteristics without any information about their affinity, although the genetic distance is a prerequisite for heterosis to a certain extent.

Recently, numerous markers for description of genetic resources have been developed such as isozymes, storage proteins or DNA based markers (ČURN 1995; ZHAO & BECKER 1998; SCHLÖTTERER 2004). At present, molecular methods have become essential parts of most studies on genetic diversity. Molecular methods are very useful for estimating features such as gene flow, genetic drift and degree of outbreeding, while other marker systems may be very useful for studying adaptive variation (RAO & HODGKIN 2002). Several methods such as

RFLP (DIERS & OSBORN 1994), RAPD (SHIRAN *et al.* 2006), AFLP (YU *et al.* 2007), SSR (HASAN *et al.* 2006), cpSSR (ZAMANI-NOUR *et al.* 2013), RAMP (WEI *et al.* 2005), SNP (HAYWARD *et al.* 2012) were used for characterization and evaluation of *B. napus* collections. These methods could improve strategies for germplasm conservation and increase the utilization of plant genetic resources. It is important, however, to understand that different markers have distinct properties, will reflect various aspects of genetic diversity and therefore can give different results (NESBITT *et al.* 1995; KARP & EDWARDS 1997). Not many studies have combined more than two molecular techniques to evaluate the pattern of genetic diversity of oilseed rape (OSR). For this reason, comparative studies of different marker systems are a necessity to determine the relative merits of the various approaches in order to allow researchers to make an appropriate choice of methodology (RAO & HODGKIN 2002).

The aim of this study was to examine the genetic diversity among the selected accessions of winter oilseed rape by molecular markers. Comprehensive examination of the characteristics of this diversity at a molecular level subsequently provides a set of the most diverse genotypes for use in line and hybrid breeding programmes. Furthermore, this investigation could also provide a direct comparison of three molecular marker systems for the assessment of oilseed rape genetic diversity.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. The core collection of 94 *B. napus* genotypes, assembled by breeders under the Czech Rape Association, including selected landraces, modern and older cultivars from different geographical regions and current breeding materials with different qualitative traits, was used for molecular analyses. Seeds of all *B. napus* genotypes were obtained from Crop Research Institute (CRI), Prague and from Research Institute of Oilseed Crops, Opava. The investigated accessions and their origins are listed in Table 1.

DNA isolation and ISSR, SSR and AFLP analyses. Total DNA was isolated from 100 mg of samples of lyophilized cotyledons collected from 36 representative plants per genotype. DNA was extracted using the CTAB extraction protocol (DOYLE & DOYLE 1987). After initial testing of a wide range of 30 ISSR primers, three primers generating the stable and repeatable pattern of markers were selected for ISSR analyses:

Table 1. List of *Brassica napus* accessions selected for molecular analyses

No.	Accession name	Type	Country of origin	Year of first registration
1	Adriana	C	FR/UK/DE	2006
2	Aglona	C	CZ	1993
3	Aplaus	C	CZ	2007
4	Arot	C	DE	2010
5	Asgard	C	DE	2006
6	Atlantic	C	FR	2005
7	Bellevue	C	DE	2007
8	Benefit	C	CZ	2009
9	Cadeli	C	US	2007
10	Californium	C	FR	2002
11	Catana	C	US/UK/FR	2006
12	Compakt	C	DE	2008
13	Contact	C	FR, DE	2000
14	Da Vinci	C	DE	2009
15	Dangal	C	UA	
16	Dar Laniv	C	UA	
17	Digger	C	DE	2000
18	DK Cabernet	C	US	2007
19	DK Casper	C	US	2009
20	ES Alegria	C	FR	2008
21	ES Astrid	C	FR	2003
22	ES Venus	C	FR	2009
23	Express	C	DE/UK	1999
24	Falcon	C	DE	1993
25	Goya	C	DE	2007
26	Chagall	C	DE	2008
27	Idol	C	FR	1995
28	Iwan	C	DE	2007
29	King 10	C	DE	2008
30	Komando	C	FR/DE	2006
31	Labrador	C	FR	2005
32	Ladoga	C	FR	2004
33	Loreley	C	DE	2008
34	Manitoba	C	FR, DE	2005
35	Mickey	C	AT	2009
36	Mira	C2	CS	1978
37	Mirage	C	DE	2007
38	Navajo	C	UK	1999
39	NK Diamond	C	FR	2008
40	NK Fair	C	FR	2004
41	NK Morse	C	FR	2000
42	NK Nemax	C	FR	2007
43	NK Passion	C	FR	2005

Table 1 to be continued

No.	Accession name	Type	Country of origin	Year of first registration
44	Odila	C	CZ	1997
45	Oksana	C	CZ	2007
46	Omaha	C	UK	2000
47	Omikron	C	CZ	1995
48	Oponent	C	CZ	2006
49	Opus	C	CZ	2007
50	Remy	C	DE	2007
51	Robust	C	DE	2005
52	Sherlock	C	DE	2009
53	Silesia	C2	CS	1983
54	Siska	C	DE	2005
55	Slapská	C1	CS	1945
56	Slapská Stela	C	CZ	1996
57	Solida	C2	CS	1986
58	Sonáta	C	CS	1990
59	Sveta	C	UA	
60	Totem	C	FR	2008
61	Třebíčská	C1	CS	1941
62	Vittek	C	DE	2009
63	Winner	C	DE	2001
64	Wisent	C	DE	2010
65	Zhongshuang No. 9	C	CN	
66	3196/1n	BF	CZ	
67	3258/1n	BF	CZ	
68	3338/i	BF	CZ	
69	4924/4	BF	CZ	
70	C 542	B	CZ	
71	C 547	B	CZ	
72	C 567	B	CZ	
73	ČŽL 20	BY	CN	
74	ČŽL 24	BY	CN	
75	DH 4729/09	B	CZ	
76	DH 4736/09	B	CZ	
77	OP 4947/07	B	CZ	
78	SG-C 2269	B	CZ	
79	SG-C 768	B	CZ	
80	SL 737	B	CZ	
81	Rf 4069/2	CMSO	CZ**	
82	Rf 4108/3	CMSO	CZ**	
83	A115 CMS line	CMSO	CZ**	
84	Rf 3358	CMSO	CZ**	
85	Rf 3372	CMSO	CZ**	
86	Rf 3388	CMSO	CZ**	

Table 1 to be continued

No.	Accession name	Type	Country of origin	Year of first registration
87	OP 1 (mCMSS for S3)	CMSS	CZ	
88	S2 -CMS	CMSS	CZ*	
89	S3 -CMS	CMSS	CZ*	
90	S7/1/2 (Rf for CMSS S2; S3)	CMSS	CZ*	
91	AIK 128/1 (Tandem 6/85)	SI	CZ	
92	AIK 20/9 (WRG 15)	SI	CZ	
93	AIK 21/55 (Liropa)	SI	CZ	
94	AIK 22/17 (Tandem 1/85)	SI	CZ	

Country codes – see ISO 3166-1; CZ* – Chinese donors of CMS backcrossed to Czech lines/cultivars; CZ** – French donors of CMS backcrossed to Czech lines/cultivars; L – landrace; C – cultivar; C1 – old cultivars and landraces, C2 – “0” type, C – “00” type cultivars; B – breeding material – oil yield; BF – breeding material – changed content of fatty acids; BY – yellow-seeded breeding material; CMSO – CMS *Ogu*-INRA genetic resources; CMSS – CMS *Shaan* 2A genetic resources (mCMSS – maintainer; Rf – restorer); SI – self-incompatible genetic resources

UBC 812 (5'-GA)₈A-3'; UBC840 (5'-GA)₈YT-3' and UBC 845 (5'-CT)₈RG-3'. PCR amplification reactions were carried out in the total volume of 10 µl containing 1× PPP Master Mix (Top-Bio), 12.5 pmol of primer, 1× BSA and 50 ng template DNA. Amplifications were performed using the following programme: pre-denaturation for 2 min at 95°C, 40 cycles of 20 s at 93°C, 1 min 52°C and 20 s at 72°C, finally, 6 min at 72°C. PCR products were dissolved by electrophoresis on 2% agarose gel in 1× TBE buffer using the following programme: 20 min at 40 V followed by 280 min at 80 V and visualized by EtBr staining. All analyses were performed in pairs, and only samples with the same pattern of ISSR markers were scored. Altogether 19 SSR markers were selected according to variability (PIC value between 0.5 and 0.8, number of alleles between 5 and 10) with high stability and low stutter and genome position (one each chromosome to cover all chromosomes present in *B. napus*). PCR amplification, detection and analysis of microsatellites were performed according to PLIESKE and STRUSS (2001). AFLP analysis was carried out as described

by Vos *et al.* (1995) with three primer combinations: *EcoRI*+*ACG/Mse*+*AGT*, *EcoRI*+*ACG/Mse*+*ACC* and *EcoRI*+*ACG/Mse*+*ATT*. PCR products were analysed using capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3130xl sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) and data were analysed by GeneMapper software.

Band scoring and data analysis. Molecular data were analysed using a digital image analysis and fingerprint patterns from each of the three marker types (ISSR, SSR and AFLP) were transformed into a binary character matrix with 1 for the presence or 0 for the absence of a band at a particular position in a lane. Genetic distance matrices were generated using NEI and LI (1979) metrics. For all three molecular markers the Weighted Arithmetic Mean of genetic distances (WAM) was calculated on the basis of frequency values in the appropriate class of genetic diversity. In this study 94 accessions were analysed, thus, a lower half distance matrix consisting of 4371 elements = values of genetic distance between two particular accessions $(((94 \times 94) - 94)/2 = 4371)$, and these values were divided into classes ranging each 5 percent and displayed in the form of histogram for each marker used. Cluster analysis (UPGMA) and principal coordinates analysis (PCO) were also performed. These analyses were calculated using MVSP 3.1 (Kovach Computing Services, Anglesey, U.K.) and DARwin 5.0.158 (CIRAD, Montpellier, F)

software packages. Genetic structure was calculated using Structure 2.3.4 software package (PRITCHARD *et al.* 2000). To determine the most likely number of clusters we followed the approach of EVANNO *et al.* (2005) and KOLÁŘ *et al.* (2012).

RESULTS

Microsatellites, AFLP and ISSR generated 89, 1003 and 53 bands, which were 100, 53.94 and 90.57% polymorphic, respectively. From the obtained patterns, it was possible to identify all analysed accessions even when closely related breeding lines, undefined breeding materials or doubled haploid (DH) lines were included in the molecular analyses. Clear recognition of all analysed accessions is demonstrated from outputs of PCO (Figure 1) and cluster – UPGMA analyses (Figure 2). Although these results allow the unambiguous identification of genetic resources via particular and quite uneven distribution, no clustering depending on the origin (breeding or geographical) was evident. Nevertheless, one exception was detected, regarding the group of specific accession CMS *Ogu*-INRA genetic resources: there is a close relationship between mother CMS line and Rf lines that should be taken into account when choosing suitable diverse components to improve these materials.

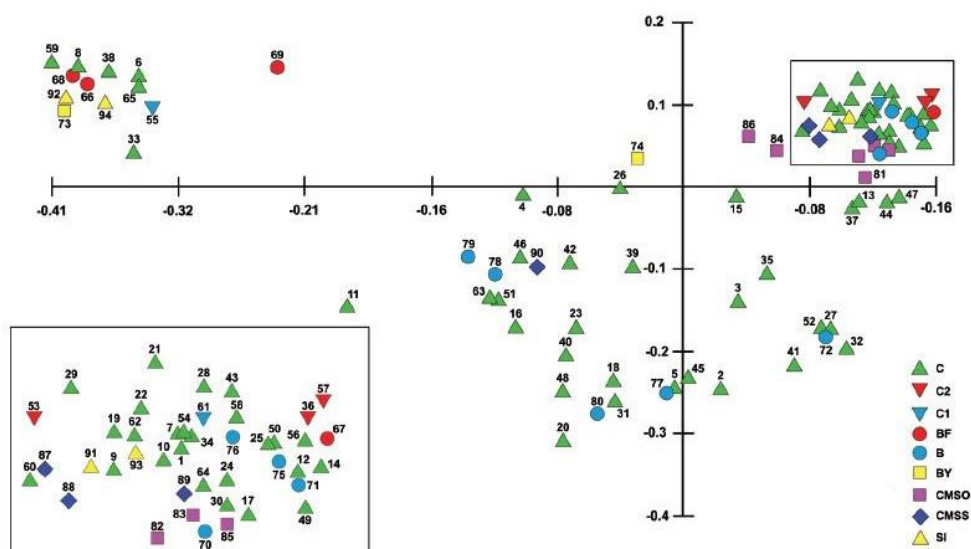


Figure 1. Principal coordinates analysis (PCO) of SSR, ISSR and AFLP markers in 94 *Brassica napus* accessions C – cultivar; C1, C2, BF – breeding material – changed content of fatty acids; B – breeding material – yield of oil; BY – yellow-seeded breeding material; CMSO – CMS *Ogu*-INRA genetic resources; CMSS – CMS *Shaan 2A* genetic resources; SI – self-incompatible genetic resources; dense group of samples in the right upper corner is shown in detail window; for explanation of symbols used for different types of plant material see Table 1

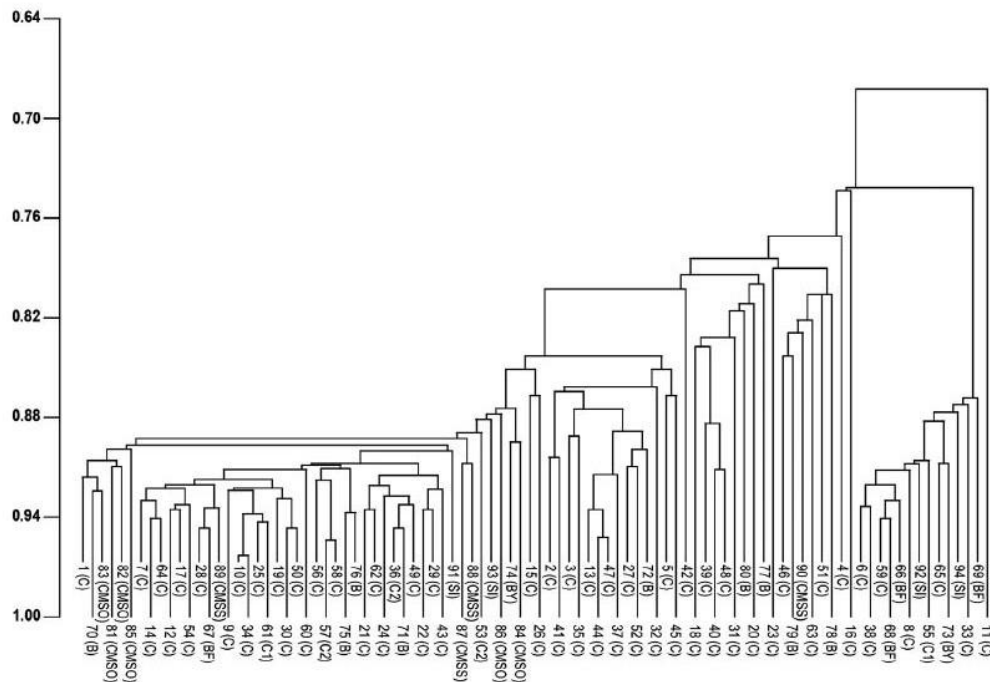


Figure 2. Cluster analysis (UPGMA dendrogram) of SSR, ISSR and AFLP markers in 94 *Brassica napus* accessions

Three molecular marker systems used in this study differed also in the extent of detected diversity. Particular genetic distances between two specific items can be obtained from a distance matrix (not shown, available on the website: <http://biocentrum.zf.jcu.cz/projekty.php>) and character and distribution of genetic diversity for all three markers are given in Figure 3. For ISSR represented markers with the highest detectable extent of genetic variation; the lowest genetic distances (0.038) were determined between five pairs of accessions (10-43, 21-69, 49-67, 66-67 and 75-76), the highest distance (0.623) between 81 (CMSO) and 87 (mCMSS for S3) with French and Czech origin, respectively. In SSR the lowest genetic distances (0.022) were recorded in closely related modern German cultivars (13-26) and breeding materials (75-78), the highest distance (0.494) was observed between old Czech cultivar Silesia (53) and Chinese cultivar Zhongshuang No. 9 (65). AFLP manifested generally a higher level of genetic similarity; the lowest genetic distance (0.037) was between French cultivars Californium and Manitoba (10, 34), the highest distance (0.355) between US cultivar Catana and French NK Morse (11, 41), respectively.

All three molecular markers differed not only in the extent of detectable genetic diversity but also in the ability to detect the genetic diversity among

individual accessions. This parameter was expressed as WAM and reflects the frequency and size of the genetic distance. The highest genetic distances between *B. napus* accessions were recorded using ISSR markers, where WAM among all 94 accessions was 25.71%. SSR markers reached average WAM (22.51%) and the highest similarity and dense clustering of samples were recorded in AFLP (WAM = 18.68%).

Results and outputs from the STRUCTURE software are given in Figure 4. Classification of accessions according to Q1/Q2 values (Figure 4D) led to the formation of three blocks: (a) the first block included accessions with Q1 value in the range of 0.003–0.013 with prevalence of Czech breeding materials or genotypes which were widely used in recent Czech breeding programmes; (b) the second block formed a transition zone; and (c) the third block included accessions with Q1 values in the range of 0.991–0.998 (Q2 = 0.009–0.002). The second and third blocks included accessions without clearly visible character of classification. Similar results are presented in Figure 4C, when classification is done according to the year of registration (release) of a particular cultivar. More informative are results presented in Figure 4B, where the data are classified by the country of origin and year of registration (release) of a particular cultivar. A similar pattern of genetic

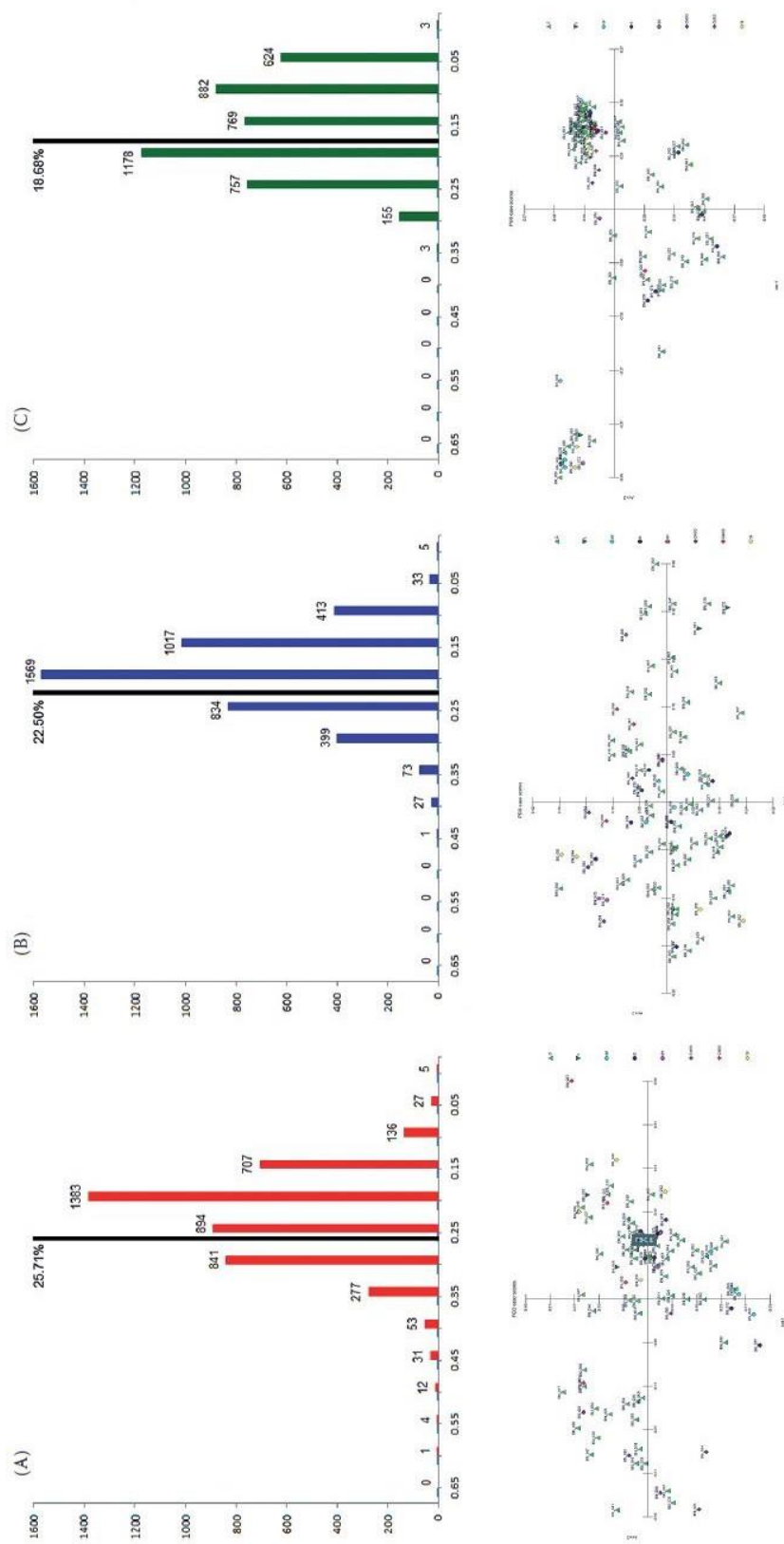
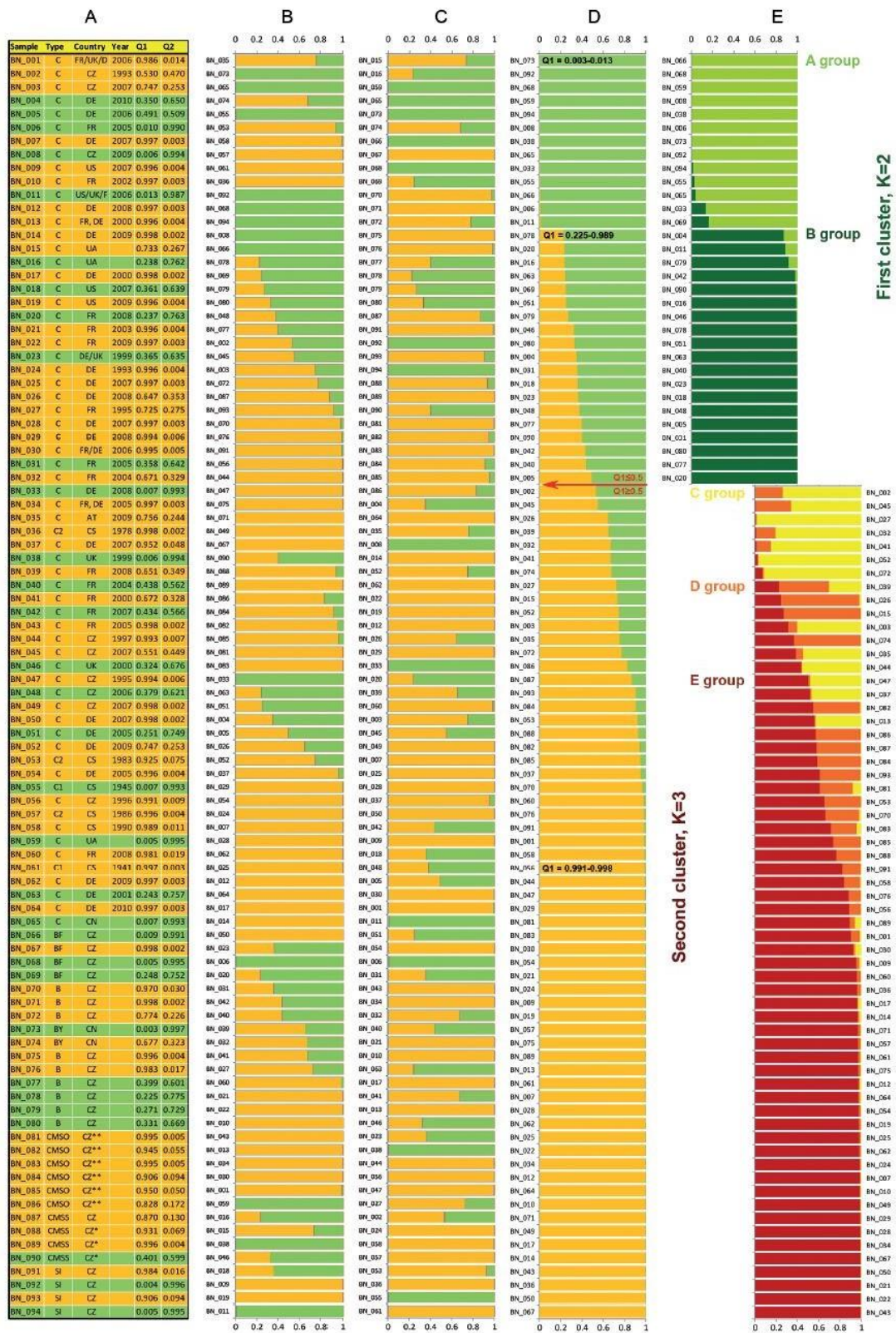


Figure 3. Comparison of the extent and distribution of genetic diversity in all three analysed marker systems A – ISSR; B – AFLP; C – SSR; x-axis – classes of genetic diversity (range 0–1, corresponding to 0–100% of genetic diversity); y-axis – number of occurrences in a particular class (94 accessions generated a lower distance half matrix of 4371 elements, unit distances on the main diagonal are not included in the total number of elements); black line – position of WAM; clustering of samples based on PCA analysis is shown schematically below the histogram representing the distribution of genetic diversity



structure is found in accessions of Czech, German as well as French or Chinese origin. Detailed assessment of the genetic structure of the analysed OSR cultivars and breeding materials based on the analysis of the two individual clusters (divided by value $Q1 \leq 0.5$ and $Q1 \geq 0.5$) identified material based on a set of allele frequencies within these clusters into 5 groups in total (Figure 4E). The analysis of the first cluster divides in detail the population structure into two sub-clusters, where most representatives of group A belong to the Czech material used mainly in CRI, while group B contains predominately European cultivars released in the period 1999–2010. The second cluster was further divided into three groups, where the main group E mostly contains Czech cultivars and materials for SI and CMS, German and French cultivars. Groups D and C include assorted cultivars of the world and of different ages.

DISCUSSION

Due to its relatively narrow genetic base, oilseed rape improvement is increasingly reliant on evaluation of its genetic diversity, better management of breeding population (COWLING *et al.* 2012) and utilization of existing genetic diversity in order to establish a promising breeding programme (LOMBARD *et al.* 2000; ASGHARI *et al.* 2011). In oilseed rape, unlike several other important crops, we cannot use sources of genetic variation from natural populations (PRAKASH & HINATA 1980) and therefore techniques and approaches recognizing the extent of genetic variability are very beneficial. Molecular markers used in this study have also been used as effective tools to provide molecular data and evaluate genetic relationships in other studies although they did not include such diverse genetic resources (SOBOTKA *et al.* 2004; LI *et al.* 2011; ABDELMIGID 2012). The importance and benefit of this study lies in the direct comparison of all accessions tested by three molecular techniques and their genetic diversity evaluation for the purposes of combinational crossing of distant genotypes in line and hybrid breeding.

Molecular analyses of 94 *B. napus* accessions performed in this study did not surprisingly confirm as-

sumptions about the narrow genetic base of rapeseed core collection (GIRKE *et al.* 2012). Such an assumption is correct only if restricted sets of oilseed rape are analysed (e.g. materials from a particular breeding programme). Results of molecular analyses also revealed high genetic distances between modern cultivars and breeding materials of special purposes. Similar results were presented on the panel of Australian germplasm by COWLING (2007). All three molecular markers, distinct in their nature and performance, differed in the extent and ability to detect diversity. Some comparative analyses suggest that AFLPs are the most suitable markers, with the most monomorphic fragments (RUSSELL *et al.* 1997; PEJIC *et al.* 1998), but high discriminatory power (BEHERA *et al.* 2008) due to a high number of bands in a single amplification (PEJIC *et al.* 1998). However, based on easier technology used, it seems that the most successful technique is ISSR which combines most advantages of SSR and AFLP technologies (REDDY *et al.* 2002) and provides the best information about genotypes in terms of their genetic distances. SSR, ISSR and AFLP provide polymorphic information based on DNA repeat variation and DNA sequence polymorphisms and all markers have been proved as suitable for distinguishing between genotypes that are genetically very similar (MCGREGOR *et al.* 2000; SARWAT *et al.* 2008). Therefore, the selection of a suitable marker is more dependent on the price and technologies available for target users.

For an overall assessment of genetic variability and the degree of diversity of rapeseed genetic resources in the analysed collection in addition to standard descriptive characteristics (type of marker, polymorphic bands, marker analysis using UPGMA and PCO approaches) other two procedures were applied. To evaluate the extent of detectable genetic diversity between individual accessions the parameter WAM was exploited. The STRUCTURE software package for assessment of multi-locus genotype data was used for evaluation of the genetic structure in rapeseed accessions. Results from both these approaches show the more valuable interpretation of the results, allow direct comparison and selection marker system and also highlight another way to process the genetic diversity data. Assessment of

←
Figure 4. Results of the analysis of genetic structure of accessions from the rape core collection using the Structure software package (Admixture Model, Allele Frequencies Correlated, $K = 2$, Length of Burnin Period and MCMC: 100 000); 4A – list of analysed accessions, their characteristics, $Q1$ and $Q2$ values (outputs of Structure analysis) and sorting according to $Q1$ value (4D – lowest to highest); 4B and 4C – sorting according to the country of origin and year of registration (release), respectively; 4E detailed analysis of cluster 1 ($Q1 \leq 0.5$) and cluster 2 ($Q1 \geq 0.5$) from the main cluster 4D that divided the core collection into 5 subgroups

the population genetic structure is commonly used in ecological and evolutionary studies (KOLÁŘ *et al.* 2012) but not for evaluation of genetic resources. It may lead (as shown in our example) to clarification of cultivar grouping and also to recommendations for expanding the genetic background in breeding programmes. For instance, the position of Czech CMS breeding materials in group E together with French materials can be explained by the fact that these materials are based on the French donor of *Ogu*-INRA type of male sterility. In comparison with results of Bus *et al.* (2011) we obtained a less detailed resolution of oilseed rape accessions (i.e. $K = 2$) and therefore we decided to separately evaluate populations belonging to two main clusters for the purpose of getting a more detailed resolution. This can be explained using only winter oilseed rape germplasm. The inclusion of a swede, winter OSR, semi-winter OSR, spring OSR, spring fodder and vegetable led to the formation of a less compact and more resolvable cluster (Bus *et al.* 2011).

Oilseed rape breeders may especially benefit from the precise identification of all genetic resources, using all three molecular marker systems. It was verified that ISSRs using the proposed protocol, are stable, reliable and inexpensive markers with great sensitivity to reveal genetic diversity. Detection of genetic distances between particular accessions from the core collection facilitates selection of parental components on the basis of the highest genetic diversity. Czech breeders under the Czech Rape Association apply this system of selection of parental components at present. In these cases, results of molecular analyses may help to reveal the real diversity of genetic resources of oilseed rape. Thus, they can be useful for accurate selection of parental components in hybridization programmes and can increase the efficiency of both line and hybrid breeding.

Acknowledgements. This research was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project QII11A075, Grant Agency of the University of South Bohemia in České Budějovice (GAJU 063/2013/Z) and the Project Postdoc USB (reg. No. CZ.1.07/2.3.00/30.0006) realized through EU Education for Competitiveness Operational Programme. We thank Dr. A. HARPER for reading the manuscript and helpful comments.

References

- ABDELMIGID H.M. (2012): Efficiency of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for genotype fingerprinting and genetic diversity studies in canola (*Brassica napus*). African Journal of Biotechnology, 11: 6409–6419.
- ASGHARI A., SHOKRPOUR M., CHAMANABAD H.M., SOFALIAN O. (2011): Evaluating genetic diversity of canola cultivars using morphological traits and molecular markers. Romanian Biotechnological Letters, 16: 6305–6312.
- BEHERA T., GAIKWARD A.B., SINGH A., STAUB E. (2008): Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture, 88: 733–737.
- BUS A., KOERBER N., SNOWDON R., STICH B. (2011): Patterns of molecular variation in a species-wide germplasm set of *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics, 123: 1413–1423.
- COWLING W.A. (2007): Genetic diversity in Australian canola and implications for crop breeding for changing future environments. Field Crops Research, 104: 103–111.
- COWLING W.A., CULLIS B.R., BEECK C.P., NELSON M.N. (2012): Towards genomic selection in oilseed Brassica. In: EDWARDS D., BATLEY J., PARKIN I., KOLE C. (eds): Genetics, Genomics and Breeding of Oilseed Brassicas. Science Publishers Inc., New Hampshire, 219–229.
- ČURN V. (1995): Acid phosphatase and leucine aminopeptidase isozymes as biochemical markers of homogeneity in oilseed rape androgenetic lines. Plant Growth Regulation, 16: 59–63.
- DIERS B.W., OSBORN T.C. (1994): Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germ plasm based on restriction fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 88: 662–668.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11–15.
- EVANNO G., REGNAUT S., GOUDET J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 14: 2611–2620.
- GIRKE A., SCHIERHOLT A., BECKER H.C. (2012): Extending the rapeseed gene pool with resynthesized *Brassica napus* L. I: Genetic diversity. Genetic Resources and Crop Evolution, 59: 1441–1447.
- HARPER A.L., TRICK M., HIGGINS J., FRASER F., CLISSOLD L., WELLS R., HATTORI C., WERNER P., BANCROFT I. (2012): Associative transcriptomics of traits in the polyploid crop species *Brassica napus*. Nature Biotechnology, 30: 798–802.
- HASAN M., SEYIS F., BADANI A.G., PONS-KUHNEMANN J., FRIEDT W., LUHS W., SNOWDON R.J. (2006): Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 793–802.
- HAYWARD A., MASON A., DALTON-MORGAN J., ZANDER M., EDWARDS D., BATLEY J. (2012): SNP discovery and applications in *Brassica napus*. Journal of Plant Biotechnology, 39: 1–12.

- KARP A., EDWARDS K.J. (1997): Molecular Techniques in the Analysis of the Extent and Distribution of Genetic Diversity. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 11–38.
- KOLÁŘ F., FÉR T., ŠTECH M., TRÁVNÍČEK P., DUŠKOVÁ E., SCHÖNSWETTER P., SUDA J. (2012): Bringing together evolution on serpentine and polyploidy: spatiotemporal history of the diploid-tetraploid complex of *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). *Plos ONE*, 7: 1–13.
- 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.
- LOMBARD V., BARILB C.P., DUBREUILB P., BLOUETB F., ZHANGA D. (2000): Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Science*, 40: 1417–1425.
- MCGREGOR C., LAMBERT C., GERYLING M., LOUW J., WARNICH L. (2000): A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) germplasm. *Euphytica*, 13: 135–144.
- NEI M., LI W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269–5273.
- NESBITT K.A., POTTS B.M., VAILLANCOURT R.E., WEST A.K., REID J.B. (1995): Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity*, 74: 628–637.
- PEJIC I., AJMONE-MARSAN P., MORGANTE M., KOZUMPLICK V., CASTIGLIONI P., TARAMINO G., MOTTO M. (1998): Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1248–1255.
- PLIESKE J., STRUSS D. (2001): Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 689–694.
- PRAKASH S., HINATA K. (1980): Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas: A review. *Opera Botanica*, 1–57.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- RAO V.R., HODGKIN T. (2002): Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1–19.
- REDDY M.P., SARLA N., SIDDIQ E.A. (2002): Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9–17.
- RUSSELL R.B., SAQI M. A.S., SAYLE R.A., BATES P.A., STERNBERG M.J.E. (1997): Recognition of analogous and homologous protein folds: Analysis of sequence and structure conservation. *Journal of Molecular Biology*, 269: 423–439.
- SARWAT M., DAS S., SRIVASTAVA P.S. (2008): Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant Cell Reports*, 5: 519–528.
- SCHLÖTTERER C. (2004): The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63–69.
- SHIRAN B., AZIMKHANI R., MOHAMMADI S., AHMADI M.R. (2006): Potential use of random amplified polymorphic DNA marker in assessment of genetic diversity and identification of rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *Biotechnology*, 5: 153–159.
- SOBOTKA R., DOLANSKÁ L., ČURN V., OVESNÁ J. (2004): Fluorescence-based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *Journal of Applied Genetics*, 45: 161–173.
- STOKES D., FRASER F., MORGAN C., O'NEILL C.M., DREOS R., MAGUSIN A., SZALMA S. BANCROFT I. (2010): An Association Transcriptomics approach to the prediction of hybrid performance. *Molecular Breeding*, 26: 91–106.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995): AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.
- WEI W., YOU LIANG Z., LI C., YUMING W., ZEHONG Y. (2005): Genetic diversity among the germplasm resources of the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAMP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 473–482.
- YU C., LEIŠOVÁ L., KUČERA V., VYVADILOVÁ M., OVESNÁ J., DOTLAČIL J., HU S. (2007): Assessment of genetic diversity of yellow-seeded rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by AFLP markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 43: 105–112.
- ZAMANI-NOUR S., CLEMENS R., MÖLLERS C. (2013): Cytoplasmic diversity of *Brassica napus* L., *Brassica oleracea* L. and *Brassica rapa* L. as determined by chloroplast microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 953–965.
- ZHAO J.Y., BECKER H.C. (1998): Genetic variation in Chinese and European oilseed rape (*B. napus*) and turnip rape (*B. campestris*) analysed with isozymes. *Acta Agronomica Sinica*. 24: 213–220.

Received for publication November 6, 2013

Accepted after corrections March 14, 2014

Corresponding author:

Ing. LENKA HAVLÍČKOVÁ, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra speciální produkce rostlinné, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; e-mail: lenk@post.cz

8 Závěr

Na základě výsledků popsanych v této práci byly splněny oba nastolené cíle:

- pro charakterizaci genetické diverzity na odrůdové úrovni byly použity tři molekulární markery: SSR, ISSR a AFLP
- byla potvrzena hypotéza, že na základě vhodně vybraných markerů lze spolehlivě identifikovat jednotlivé odrůdy u druhu *Brassica napus*
- všechny použité markery prokázaly dostatečnou stabilitu, opakovatelnost a měly dostatečné množství reprodukovatelného spektra markerů
- na základě vypovídací schopnosti, finanční náročnosti a pracnosti byl jako nejvhodnější marker vybrán ISSR
- tento marker byl zaveden do standardních metod pro hodnocení genetické diverzity u řepky na pracovišti ZF JU
- na základě několikaletého hodnocení gen. diverzity pomocí ISSR markeru byl zjištěn pozitivní posun v českém novošlechtění, kdy dochází k postupnému rozšiřování genetické diverzity
- byly otestovány tři nejvýznamnější geny S-locusu, které významně ovlivňují autoinkompatibilitu u řepky. Konkrétně geny *SLG* třídy I a II, *SCR* a *SRK*.
- pro testování *SLG* genu třídy II byla použita metoda duplex PCR. Tato metoda nám zaručuje kontrolu vhodně provedené analýzy.
- podařilo se vyvinout vhodné markery, díky kterým se podařilo spolehlivě detekovat a selektovat AI rostliny
- pomocí těchto markerů lze detekovat AI rostliny v raném ontogenetickém vývoji s dostatečnou přesností a spolehlivostí

9 Použitá literatura

- Abdelmigid, H. M., 2012. Efficiency Of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) And Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers For Genotype Fingerprinting And Genetic Studies In Canola (*Brassica napus*), African Journal of Biotechnology, 11: (24): 6409-6419
- Agrární poradensko informační centrum Agrární komory ČR, 2017. Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin – 2016. APIC-AK.
- Allender, Ch. J., King, G. J., 2010. Origins of the amphidiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear markers, BMC Plant Biology 10: (54): 1-9
- Annisa, Yiming, G., Sheng, Ch., Wallace, C., 2011. Global genetic diversity of *Brassica rap.*. 17th Australian Research Assembly on Brassicas (ARAB), Wagga Wagga NSW August 2011, 17-19
- Ash, M., 2014 Canola. United States Department of Agriculture, Economic Research Service.
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hiller, J., Veilleux, E., 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses, Genome, 44: 50-62
- Baranyk, P. a kol., 2016. Seznam doporučených odrůd, Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha
- Baranyk, P. a kol., 2016. Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2016/17, Svaz pěstitelů a zpracovatelů obilnin, Praha
- Baranyk, P., Fábry, A. a kol., 2007. Řepka, pěstování, využití, ekonomika, Profi press, Praha
- Bečka, D., Vašák, J, Zupalová, H., Mikšík, V., 2007. Řepka ozimá – Pěstitelský rádce, ČZU, Praha
- Bell, C. J., Ecker, J. R., 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*, Genomics, 19: 137-144
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R.T., Lee, S.F., Millers, A.D., 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments – an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescenc, Molecular Ecology Resources, 12: 456-463

- Brown, T.A., 2006. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, Blackwell Science Ltd., UK
- Brugiére, N., Cui, Y., Rothstein, S. J., 2000. Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility, Reviews, Elsevier Science, 5: (10): 432-438
- Butler, J. M., 2005. Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, Elsevier Academic Press, UK
- Cock, J.M., Stanchev, B., Delorme, V., Croy, R.R.D., Dumas, Ch., 1995. SLR3: a modified receptor kinase gene that has been adapted to encode a putative secreted glycoprotein similar to the S-locus glycoprotein, Mol.Gen. Genet. 248: 151-161
- Čurn, V., Havlíčková, L., Jozová, E., Jelínková, I., Hejna, O., Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., 2014. Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.), Certifikovaná metodika, ZF JU České Budějovice.
- Čurn, V., Havlíčková, L., Vondrášková, E., Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., 2012. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Čurn, V., Kukolíková, B., Havlíčková, L., Žaludová, J., 2012. Metodika detekce a molekulární selekce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.), Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum JU ZF České Budějovice
- Čurn, V., Žaludová, J., 2007. Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars, In: Gupta S. (ed.). Rapeseed Breeding, Advances in Botanical Research, 45: 155-179
- Diers, B.W., Osborn, T.C., 1994. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphism, Theor. Appl. Genet, 88: 662-669
- 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: 397-311

- Downey, R.K., 1990. *Brassica* oilseed breeding: achievements and opportunities, Plant Breed. Abstr., 60: 1165-1170
- Ehrenbergerová, J., 2014. Odrůdy, osivo a sadba. Mendelova univerzita v Brně, Brno
- Ehrlich, P., Ehrlich, A., 1983. Extinction: The cause and consequences of the disappearance of species, Ballantine, New York
- El-Esawi, M., Germaine, K., Bourke, P., Malone, R., 2016. AFLP analysis of genetic diversity nad phylogenetic relationship of *Brassica oleracea* in Ireland, C.R. Biologies, 339: (2016): 163-170
- Fábry, a kol. (1992). Olejniny. MZe. Praha
- Fernie, A.R., Tadmor, Y., Zamir, D., 2006. Natural genetic variation for improving crop quality, Curr. Opin. Plant Biol, 54: 357-374
- FSANZ, 2003. Erucic acid in food: A Toxicological Review and Risk Assessment Technical report series, Food Standards Australia New Zealand, 21: 4
- Frauen, M., Paulmann, W., 1999. Breeding of hybrid varieties of winter oilseed rape based on the MSL – systém, Proc. 10th International Rapessed Congress, 26.-29. September 1999, Cambera, Australia
- Friedt, W., Snowdon, R., Ordon, F., Ahlemeyer, J., 2007. Plant Breeding: assesment of Genetic Diversity in Crop Plants and its Exploitation in Breeding, Progress in Botany, 168: 152-177
- Frühaufová, J., 1998. Šlechtění řepky na šlechtitelské stanici Slapy u Tábora. Současný stav a perspektivy šlechtění brukvovitých plodin, Sborník referátů, 15-17
- Fujimoto, R., Okazaki, K., Fukai, E, Kusaba, M, Nishio, T., 2006. Comparison of the Genome Structure of the Slef-Incompatibility (*S*) Locus in Interspecific Pairs of S Haplotypes, Genetics, 173: (2): 1157-1167
- Gao, Ch., Ma, Ch., Zhang, X., Li, F., Zhang, J., Zhai, W., Wang, Y., Tu, J., Shen, J., Fu, T., 2013. The genetic characterization of self-incompatibility in a *Brassica napus* line with promising breedin potential, Mol Breedin, 31: 485-493
- Gao, Q., Shi, S., Liu, Y., Pu, Q., Liu, X., Zhang, Y., Zhu, L., 2016. Identification of a novel *MLPK* homologous gene *MLPKn1* and its expression analysis in *Brassica oleracea*, Plant Reprod, 29: 239-250

- Gaude, T., Rougier, M., Heizmann, P., Ockende, D.J., Dumas, C., 1995. Expression level of the SLG gene is not correlated with the self-incompatibility phenotype in the class II *S* haplotypes of *Brassica oleracea*, *Plant Mol. Biol*, 27: 1003-1014
- Giranton, J.L., Ariza, M.J., Dumas, C., Cock, J.M., Gaude, T., 1995. The *S* locus receptor kinase gene encodes a soluble glycoprotein corresponding to the SRK extracellular domain in *Brassica oleracea*, *Plant J*, 8: 101-108
- Girke, A., Schirholt, A., Becker, H.C., 2012. Extending the rapeseed genepool with resynthesized *Brassica napus* L. I: Genetic diversity, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 1441-1447
- Goring, D.R., Rothstein, S.J., 1992. The *S*-locus receptor kinase gene in self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase, *Plant Cell*, 4: 1273-1291
- Gunstone, F., 2011. *Vegetable oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*, John Wiley and Sons, UK
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats, *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 643-651
- Halldén, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M., Säll, T., Nilsson, N.O., 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in comparison of *Brassica napus* breeding lines, *Theor. Appl. Genet*, 88: 123-128
- Harper, A.L., Trick, M., Higgins, J., Fraser, F., Clisold, L., Wells, R., Hatorri, C., Werner, P., Bancroft, I., 2012. Associative transcriptomics of traits in the polyploid crop species *Brassica napus*, *Nature Biotechnology*, 30: 793-802
- Harrison, D.J., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z., Effenhauser, C.S., Manz, A., 1993. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip, *Science*, 261: 895-897
- Hasan, M., Seyis, F., Badani, A.G., Pons-Kuhnemann, J., Lühs, W., Friedt, W., Snowdon, R.J., 2006. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers, *Genet. Res. Crop. Evol*, 53: 793-802
- Hatakeyma, 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

- Havel, J., 1996. Získávání autoinpomkatibilních linií u řepky ozimé, Genet. a šlecht., 32: 9-18
- Havel, J., 1998. Šlechtění řepky ve výzkumném ústavu olejnin v Opavě, Současný stav a perspektivy šlechtění brukvovitých plodin, Sborník referátů, 12-14
- Havel, J., 1998. Využití autoinkompatibility ve šlechtění ozimé řepky, Současný stav a perspektivy šlechtění brukvovitých plodin, Sborník referátů, 18-21
- Havlíčková, L., Jozová, E., Klíma, M., Kučera, V., Čurn, V., 2014. Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for identification of the class I S haplotype, Genetics and Molecular Biology, 37: 556-559
- Havlíčková, L., Jozová, E., Rychlá, A., Klíma, M., Kučera, V., Čurn, V., 2014. Genetic diversity assesment in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) collection using AFLP, ISSR and SSR markers, Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 50: (3): 216-225
- Havlíčková, L., Klíma, M., Příbylová, M., Hilgert-Delgado, A., Kučera, V., Čurn, V., 2015. Non-Destructive In Vitro Selection Of Microspore-Derived Embryos With The Fertility Restorer Gene For CMS Ogu-INRA In Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.), Electron J Biotechn, 18: 58-60
- Hejny, S., Slavík, B., 2003. Květena 3, Academia, Praha
- Hiscock, S.J., 2002. Pollen recognition during the self-incompatibility response in plants, Genome Biology 2002: 3: (2): 1004.1-1004.6
- Hraška, Š., Bartoš, P., Maršálek, L., 1989. Špeciálna genetika poľnohospodárskych rastlín, Príroda, Bratislava
- Chang, B., Larson, E., Whitman-Guliaev, Ch., 2010. The Experion System: Microfluidics-Based Automated Electrophoresis, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
- Chen, G., Lin, Y., Wang, J., 2006. Monitoring enviromental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection, Talanta, 68: 497-503
- Cheung, F., Trick, M., Drou, N., Lim, Y.P., Park, J.Y., Kwon, S.J., Kim, J.A., Scott, R., Pires, J.C., Paterson, A.H., Town, C., Bancroft, I., 2009. Comparative analysis between homoeologous genome segments of *Brassica napus* and its

- progenitor species reveals extensive sequence-level divergence, *Plant cell* 21: 1912-1928
- Chloupek, O., 2007., *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*, Academia, Praha
 - Jordán, H., 2015. Česká republika se zapojila do celosvětové záchrany genetických zdrojů rostlin, poprvé odeslala semena do globální genové banky na Špicberkách. Tisková zpráva Mze.
 - Jozová, E., Čurn, V., 2014. Multiplexová analýza mikrosatelitů u řepky pomocí modifikovaných fluorescenčně značených primerů. *Úroda, vědecká příloha*, 2014: (12): 191-194
 - Kandasamy, M.K., Paolillo, D.J., Faraday, C.D., Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E., 1989. The *S* locus specific glycoproteins of *Brassica* accumulate in the cell wall of developing stigma papillae, *Dev. Biol.*, 134: 462-472
 - Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L, Zehr, B.E., 1995. Assesment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification, *Molecular Breeding*, 1: 365-373
 - Kitashiba, H., Nasrallah, B.J., 2014. Self-incompatibility in *Brassicaceae* crops: lessons for interspecific incompatibility, *Breeding Science*, 64: 23-37
 - Köhler, F.E., 1897. *Köhler's Medizinal-Pflanzen*, Missouri Botanic Garden, USA
 - Koprna, R., 2015. *Šlechtění rostlin. Šlechtění jednotlivých kulturních plodin*, Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc
 - Kott, L.S., 1995. Hybrid production systém based on self-incompatibility in oilseed *Brassica*, *Proc. 9th Int. Rapeseed Conf.*, Cambridge, United Kingdom, 73-79
 - Kresovich, S., McFerson, J.R., 1992. Assesment and management of plant genetic diversity – considerations of intraspecific and interspecific variation, *Field Crops Research*, 29: 185-204
 - Kresovich, S., Szewc-McFadden, A.K., Blied, 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
 - Kučera, V., Vyvadilová, M., Tomášková, D., 1998. Tvorba autoinkompatibilních linií ozimé řepky s 00 kvalitou pomocí dihaploidního

- systemu, Současný stav a perspektivy šlechtění brukvovitých plodin, Sborník referátů, 15-17
- Kusaba, M., Matsushita, M., Okazaki, K., Satta, Y., Nishio, T., 2000. Sequence and Structural Diversity of the *S* Locus Gene From Different Lines With the Same Self-Recognition Specificities in *Brassica oleracea*, *Genetics*, 154: (1): 413-420
 - Kusaba, M., Nishio, T., Satta, Y., Hinata, K., Ockende, D., 1997. Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implication for the evolution and recognition mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7673-7678
 - Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2013. *Molecular Cell Biology: Molecular Genetic Techniques*. W.H.Freeman, New York
 - Lombard, V., Baril, C.P., Dubreuil, P., Blouet, F., Zhang, D., 2000. Genetic relationship and fingerprinting of rapeseed cultivars using AFLP: consequences for varietal registration, *Crop Sci*, 40: 1417-1425
 - Luijten, S.H., de Jong, T.J., 2010. A baseline of the distribution and morphology of *Brassica napus* L. and *Brassica rapa* L. in the Netherlands. University Leiden, COGEM Report, 2010: 3
 - Lydiate, D., Sharpe, A., 2003. Aligning genetic map of *Brassica napus* using microsatellite markers, *Book of Abstract, Plant and Animal Genome XI*, San Diego, USA
 - Morinaga, T., 1929a. Interspecific hybridization in *Brassica* I. The cytology of F1 hybrids of *B.napella* and various other species with 10 chromosomes, *Cytologia* 1: 16-27
 - Morinaga, T., 1929b. Interspecific hybridization in *Brassica* II. The cytology of F1 hybrids of *B. cernua* and various other species with 10 chromosomes, *Jap. Journ. Bot*, 4: 277-289
 - Morinaga, T., 1929c. Interspecific hybridization in *Brassica* III. The cytology of F1 hybrids *B. cernua* and *B. napella*, *Journ. Dept. Agric. Kyushu Imp. Univ*, 2: 199-206
 - Morinaga, T., 1933. Interspecific hybridization in *Brassica* V. The cytology of F1 hybrid of *B. carinata* and *B.alboglabra*, *Jap. Journ. Bot*, 6: 467-475

- Morinaga, T., 1934. Interspecific hybridization in *Brassica* VI. The cytology of F1 hybrids of *B.jencea* and *B. nigra.*, *Cytologia*, 6: 62-67
- Nagaharu, U., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization, *Japan. J. Bot.*, 7: 389–452
- Nasrallah, B.J., 2000. Cell-cell signaling in the self-incompatibility response, *Plant Biology*, 3: (5): 368-373
- Nasrallah, J.B., 2011. *Genetics and Genomics of the Brassicaceae: Self-Incompatibility in the Brassicaceae*, Springer Science, UK
- Nasrallah, J.B., Nasrallah, M.E., 1993. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response, *Plant Cell*, 5: 1325-1335
- Nasrallah, J.B., Nishio, T., Nasrallah, M.E., 1991. The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression end use in genetic ablation of floral tissues, *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.*, 42: 393-422
- Newbigin, E., Anderson, M.A., Clarke, A.E., 1993. Gametophyc self-incompatibility systém, *Plant Cell*, 5: 1315-1324
- Ng, W.L., Tan, S.G., 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?, *ASM Sci.J.*, 9: (1): 30-39
- Niemann, J., Wojciechowski, A., Janowicz, J., 2012. Broadening the variability of quality traits in rapeseed through interspecific hybridiation with an application of immature embryo culture, *BioTechnologia*, 93: 109-115
- Nishio, T., Kusaba, M., Sakamoto, K., Ockende, D.J., 1997. Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (SRK) in *Brassica*: Expresion and use in genetic ablation of floral tissues, *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.*, 42: 393-422
- Nou, I.S., Watanabe, M., Isogai, A, Hinata, K., 1993. Comparison of S-alleles and S-gysoproteins between two wild-type population of *Brassica campestris* in Turkey and in Japan, *Sex. Plant Reprod.*, 6: 79-86
- O'Neill, R., Snowdon, R.J., Köhler, W., 2003. Population genetic aspects of biodiversity, *Prog. Botany*, 64: 115-137
- Okamoto, S., Odashima, M., Fujimoto, R., Sato, Y., Kitashiba, H., Nishio, T., 2007. Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in S-locus genes, *Plant J.*, 50: 391-400

- Okazaki, K., Kusuba, M., Ockende, D.J., Nishio, T., 1999. Characterization of S tester lines in *Brassica oleracea*: polymorphism of restriction length of SLG homologues and isoelectric points of S-locus glycoprotein, *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1329-1334
- Ondřej, M., Drobník, J., Gartland, K.M.A., Gartland, J.S., 1999. *Genové inženýrství rostlin*. VŠCHT, Praha
- Panigrahi, J., Kole, P., Kole, C., 2011. RFLP mapping of loci controlling self-incompatibility in *Brassica campestris* and their comparative mapping with *B.napus* and *B.oleracea*, *Biologia Plantarum*, 55: 54-60
- Pastuglia, M., Roby, D., Dumas, C., Cock, J.M., 1997. Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*, *Plant Cell*, 9: 49-60
- Peterson, A.H., Lan, T., Amasino, R., Osborn, T.C., Quiros, C., 2001. *Brassica* genomics: a complement to, and early beneficiary of, the *Arabidopsis* sequence, *Genome Biology*, 2: (3): 1011.1-1011.4
- Pilinsky, S., Szoke, A., Kiss, E., Heszky, L., Falusi, J., 2011. Characterization of oilseed genotypes using microsatellite based DNA barcode, 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 250
- Plieske, J., Struss, D., 2001. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. Development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species, *Theor Appl Genet*, 102: 689-694
- Potměšilová, J., 2012. Šlechtění, agrotechnika, výnos a ceny, České šlechtění, Zemědělec, Profi Press, Praha
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C.H., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, *Molecular breeding*, 2: 225-238
- Poyraz, I., 2016. Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques, *C.R. Biologies*, 339: (2016): 171-178
- Proctor, M., Yeo, P., Lack, A., 1996. *The natural history of pollination*, Timber Press. Inc, Oregon, USA
- Przybylski, R., 2011. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses. Canola/Rapeseed Oil*, Blackwell Publishing Ltd., UK
- Pua, E.C., Douglas, C.J., 2004. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Brassica*, National University of Singapore, Singapore

- Rahmna, M.H., 2008. Resynthesis of *Brassica napus* L. for self-incompatibility: self-incompatibility reaction, inheritance and breeding potencial, *Plant Breeding*, 124: 13-19
- Rai, B., Gupta, S.K., Pratap, A., 2007. Breeding methods. *Advances in Botanical Research*, 45, Incorporating Advances in Plant Pathology, Rapeseed Breeding, Academic Press Elsevier, UK
- Rao, V.R., Hodgkin, T., 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1-19
- Rea, A.C., Nasrallah, J.B., 2015. *In vivo* imagine of the *S*-locus receptor kinase, the female specificity determinant of self-incompatibility, in transgenic self-incompatible *Arabidopsis thaliana*, *Annals of Botany*, 115: 789-805
- Robyt, J. F., White, B.J., 1990. *Biochemical Techniques Theory and Practice*, Illinois, Waveland Press
- Rod a kol., 1982. *Šlechtění rostlin*, SZN, Praha
- Řepková, J., 2013. *Genetika rostlin*, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Ústav experimentální botaniky, Brno
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., Martin, W., 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East, *Nat. Rev. Genet.*, 3: 429-441
- Samuel, M.A., Yee, D., Haasen, K.E., Goring, D.R., 2008. „Self“ Pollen Rejection Through the Intersection of Two Cellular Pathways in the *Brassicaceae*: Self-Incompatibility and Compatible Pollen Response. *Self-Incompatibility in Flowering Plants – Evolution, Diversity, and Mechanisms*, Springer-Verlag, Berlin
- Shi, S., Gao, Q., Zeng, J., Liu, X., Pu, Q., Liu, G., Zhang, H. Yang, X., Zhu, L., 2016. N-terminal domains of ARC1 are essential for interaction with N-terminal region of Exo70A1 in transducing self-incompatibility of *Brassica oleracea*, *Acta Biochim Biophys Sin*, 48: (9): 777-787
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B., 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*, *Science*, 286: 1697-1700
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, *Nature Biotechnology*, 18: 233-234
- Snowdon, R., Lühs, W., Friedt, W., 2007. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Oilseed Rape*, 2: (2007): 55-114

- Snustad, P. D., Simmons, M.J., 2009. Genetika, Masarykova univerzita, 2009 Brno
- Sobotka, R., 2001. Analýza genu SLG a jeho využití jako selekčního markeru ve šlechtění řepky olejně. Disertační práce. České Budějovice
- Sobotka, R., Sáková, L., Čurn, V., 2000. Molecular Mechanisms of Self-Incompatibility in *Brassica*, *Issues Mol. Biol*, 2: (4): 103-112
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J., 1998. Molecular Systematics of Plants II DNA Sequencing, Kluwer Academic Publishers, Novell, MA
- Song, K., Osborn, T.C., 1992. Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organella and nuclear RFLP analyses, *Genome*, 35: 992-1101
- Song, K.M., Osborn, T.C., Williams, P.H., 1990. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationship in *Brassica* and related genome origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*), *Theor. Appl. Genet*, 79: 497-506
- Stone, S., Arnold, M., Goring, D., 1999. A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants, *Science*, 286: 1729-1731
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., 2008. *Metody molekulární biologie: I Purifikace a separace nukleových kyselin*, MU Brno, Brno
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.S., Kai, N., Watanebe, M., Suzuki, G., Hinata, K., Isogai A., 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1920-1925
- Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A, Tivang, J.G., Osborn, T.C., 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationship within and among cruciferous species, *Theor. Appl. Genet*, 88: 973-980
- Tian, L., Miao, W., Liu, J., Fang, Z., Liu, Y., Yang, L., Zhang, Y., Zhuang, M., 2013. Identification of S haplotypes in cabbage inbred lines (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), *Scientia Horticulturae*, 164: 400-408
- Trostle, R., 2010. *Global Agricultural Supply and Demand: Factors Contributing to the Recent Increase in Food Commodity Prices*, DIANE Publishing, USA

- U, N., 1935. Genome-analysis in *Brasica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization, Jap. Journ. Bot, 7: 389-452
- Udagawa, H., Ishimaru, Y., Li, F., Sato, Y., Kitashiba, H., Nishio, T., 2011. Genetic analysis of interspecific incompatibility in *Brassica rapa*, Theor Appl Genet, 121: 689-696
- UPOV, 2002. General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized description of new varieties. Geneva
- Uzunova, M., Ecke, W., Wiesslerer, K., Röbbelen, G., 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content, Theor Appl Genet, 90: 194-204
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications, Trends Biotech, 23: 48-55
- Vašák a kol., 2000. Řepka. Agrospoj. Praha.
- Volf, M., Zeman, J., 2013. Výsledky pěstování řepky v České republice v roce 2012/13, 30. vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky Systém výroby Slunečnic, Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, SPZO s.r.o., Praha
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acid Research, 23: (21): 4407-4414
- Voškeruša, J., 1992. Hybridní šlechtění řepky olejky, Ministerstvo zemědělství ČR, Praha
- Warwick, S.I., Francis, A., Al-Shehbaz, I.A., 2006. *Brassicaceae*: species checklist and database on CD-Rom, Plant Syst Evol, 259: 249-258
- Watabe, M., Suwabe, K., Suzuki, G., 2012. Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility: In *Brassicaceae*, Proceeding of the Japan Academy Ser B Physical and Biological Science, 88: (10): 519-535
- Watanabe, M., Ito, A., Takada, Y., Ninomiya, C., Kakizaki, T., Takahata, Y., Hatakeyma, K., Hinata, K., Suzuki, G., Takasaki, T., Satta, Y., Shiba, H., Takayma, S., Isogai, A., 2000. Highly divergent sequence of the pollen self-incompatibility (S) gene in class-I S haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*), L.FEBS Lett, 12: 139-144

- Weising, K, Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W., 2005. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi, CRC Press, Boca Raton, FL
- Wen, J., Tu, J.X., Li, Z.Y., Fu, T.D., Ma, C.Z., Shen, J.X., 2008. Improving ovary and embryo culture techniques for efficient resynthesis of *Brassica napus* from reciprocal crosses between yellow-seeded diploids *B. rapa* and *B. oleracea*, *Euphytica*, 162: 81-89
- Westman, A. L. and S. Kresovich, 1998. The potential for cross-taxa simple sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop Brassicas, *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 272-281
- Wolko, L., Slomski, R., 2012. Plant Self-incompatibility: Or, Self-Induction of Population Genetic Diversity, *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, Rijeka, 73-88
- Wu, D., Qin, J., Lin, B., 2008. Electrophoretic separations on microfluids chips. *Journal of Chromatography A.*, 1184: 542-559
- Wu, K.S., Jones, R., Danneberger, L., Scolni, P.A., 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning, *Nucleic Acid Research*. 22: 3257-3258
- Yip, P.Y., Chau, Ch.F., Mak, Ch.Y., Kwan, H.S., 2007. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials, *Chin Med.*, 2: (9): 1-19
- Yu, C., Leišová, L., Kučera, V., Vyvydilová, M., Ovesná, J., Dotlačil, J., Hu, S., 2007. Assessment of genetic diversity of yellow-seeded rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by AFLP markers, *Czech Journal of Genetics and Plant Breedin*, 43: 105-112
- Zamani-Nour, S., Clemens, R., Möllers, Ch., 2012. Cytoplasmatic diversity of *Brassica napus* L., *Brassica oleracea* L. and *Brassica rapa* L. as determined by chloroplast microsatellite markers, *Genet Resour Crop Evol*, 60: 953-965
- Zamir, D., 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries, *Nat. Rev. Genet*, 2: 983-989
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review, *Mol. Ecol*, 11: 1-16
- Zehnálek, P., 2012. Seznam doporučených odrůd řepka olejka 2012, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní odrůdový úřad
- Zhai, W., Zhang, J., Yang, Y., Ma, Ch., Liu, Z., Gao, Ch., Zhou, G., Tu, J., Shen, J., Fu, T., 2014. Gene expression and genetic analysis reveal diverse

- causes of recessive self-compatibility in *Brassica napus* L., *BMC Genomics* 15: 1037-1046
- Zhang, X., Ma, Ch., Yin, D., Zhu, W., Gao, Ch., Zhang, J., Fu, T., 2013. Characterization of *S* Haplotype in a New Self-Compatible *Brassica rapa* cultivar Danuangyoucai, *Czech J. Genet. Plant Breed*, 49: (4): 157-163
 - Zhang, X., Yin, D., Zhu, W., 2011. Progress on characterization of self-incompatibility in *Brassica napus* L., *Euphytica*, 182: 147-155
 - Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 20: 176-183

10 Publikace a metodiky

Publikace impaktivé

- Havlíčková, L., Čurn, V., Jozová, E., Kučera V., Vyvadilová, M., Klíma, M., 2012. Sequence analysis of the mtDNA region correlated with *Shaan 2A* cytoplasmatic male sterility in rapessed (*Brassica napus* L.), Czech J. Genet. Plant Breed, 48: 139-142
- Žaludová, J., Havlíčková, L., Jozová, E., Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., Čurn, V., 2013. Marker assisted selection as a tool detection of *Brassica napus* plants carrying self-incompatibility alleles, in hybrid breeding programs, Romain Agricultural Research, 30: 13-22
- Havlíčková, L., Jozová, E., Rychlá, A., Klíma, M., Kučera, V., Čurn, V., 2014. Genetic diversity assesment in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) cellation using AFLP, ISSR and SSR markers, Czech Jouranl of Genetics and Plant Breeding, 50: (3): 216-225
- Havlíčková, L., Jozová, E., Klíma, M., Kučera, V., Čurn, V., 2014. Detection of self-incompatible oilseed rape plants (*Brassica napus* L.) based on molecular markers for identification of the class I S haplotype, Genetics and Molecular Biology, 37: 556-559

Publikace recenzované

- Havlíčková, L., Jozová, E., Čurn, V., Kučera, V., Klíma, M., Vyvadilová, M., 2012. Molecular markers in breeding programmes of rapeseed: identification of CMS *Shaan 2A* restorers, Úroda - vědecká příloha, 2012: (9): 150-153,
- Havlíčková, L., Jozová, E., Hejna, O., Čurn, V., 2012. Využití molekulárních markerů ve šlechtění F1 hybridních odrůd řepky (*B. napus* L.), Úroda - vědecká příloha, 2012: (12): 151-154
- Jozová, E., Havlíčková, L., Čurn, V., Kučera, V., Klíma, M., Vyvadilová, M., 2012. Hodnocení genetických zdrojů řepky olejky (*Brassica napus* L.): studium genetické diverzity pomocí techniky analýzy mikrosatelitů, Úroda – vědecká příloha, 2012: (9): 164-167

- Jozová, E., Havlíčková, L., Čurn, V., Kučera, V., Klíma, M., Vyvadilová, M., 2012. Využití molekulárních markerů pro hodnocení diverzity genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.), Úroda - vědecká příloha, 2012: (12): 159-162
- Čurn, V., Jozová, E., Kučera, V., 2013. Využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky – možnosti a perspektivy, Úroda – vědecká příloha, 2013: (12): 18-23
- Jozová, E., Havlíčková, L., Čurn, V., 2013. Molekulární přístup k hodnocení genetických zdrojů řepky, Úroda – vědecká příloha, 2013: (12): 146-149
- Jozová, E., Čurn, V., 2014. Multiplexová analýza mikrosatelitů u řepky pomocí modifikovaných fluorescenčně značených primerů, Úroda – vědecká příloha, 2014: (12): 191-194
- Čurn, V., Jelínková, I., Jozová, E., Havlíčková, L., Klíma, M., 2016. Ověření spolehlivosti molekulárních selekčních markerů pro identifikaci obnovitelů fertility u CMS systému *Shaan 2A*, Úroda – vědecká příloha, 2016: (12): 39-43
- Jozová, E., Jelínková, I., Čurn, V., 2016. Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů řepky jako podklad pro výběr rodičovských komponent pro křížení, Úroda – vědecká příloha, 2016: (12): 153-156

Publikace ve sborníku

- Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., Vrbovský, V., Plachká, E., Macháčková, I., Šmirous, P. Poslušná, J., Horáček, J., Buzek, Z., Čurn, V., Havlíčková, L., Jozová, E., 2012. Výsledky sdružení Česká řepka v roce 2012, Sborník Hluk 2012, 29. vyhodnocovací seminář 21.-22.11.2012, SPZO s.r.o., s. 34-42
- Klíma, M., Havlíčková, L., Jozová, E., Rychlá, A., Kučera, V., Čurn, V., 2013. Diverzita genetických zdrojů ozimé řepky, Sborník prací z 30. vyhodnocovacího semináře „Systém výroby řepky, Systém výroby slunečnice, SPZO, SPZO s.r.o., Praha, 51-54.
- Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., Vrbovský, V., Plachká, E., Macháčková, I., Šmirous, P. Poslušná, J., Buzek, Z., Čurn, V., Havlíčková, L., Jozová, E., 2013. Výsledky Sdružení Česká řepka v roce 2013, 30. vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky Systém výroby Slunečnice, Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, SPZO s.r.o., Praha, 45-50.

- Kučera, V. a kol., 2014. Výsledky sdružení Česká řepka v roce 2014, Sborník referátů 31. Vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky Systém výroby slunečnice, HLUK, 19.-20.11.2014, SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha, 48-56
- Klíma, M., Bělská, K., Čurn, V., Endlová, L., Havlíčková, L., Hejna, O., Hilgert-Delgado, A., Horáček, J., Horák, J., Jelínková, I., Jozová, E., Kučera, V., Macháčková, I., Plachká, E., Poslušná, J., Prášil, I., Rychlá, A., Řičica, M., Šmirous, P., Tyller, V., Urban, M., Větrovcová, M., Vítámvás, P., Vrbovský, V., 2015. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2015. 32. vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky Systém výroby slunečnice. SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha, Praha, 47-53
- Klíma, M., Bělská, K., Čurn, V., Endlová, L., Havlíčková, L., Hejna, O., Hilgert-Delgado, A., Horáček, J., Horák, J., Jelínková, I., Jozová, E., Kučera, V., Macháčková, I., Plachká, E., Poslušná, J., Prášil, I., Rychlá, A., Řičica, M., Šmirous, P., Tyller, V., Urban, M., Větrovcová, M., Vítámvás, P. & Vrbovský, V. 2016. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2016. 33. vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky Systém výroby slunečnice, SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha, 114-119

Metodiky

- Čurn, V., Havlíčková, L., Vondrášková, E., Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., 2012. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum JU ZF České Budějovice
- Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., Čurn, V., Havlíčková, L., Jozová, E., Macháčková, I., 2013. Metodika tvorby rodičovských komponent a hybridů ozimé řepky (*Brassica napus* L.) na bázi CMS. VÚRV, v.v.i Praha, Praha
- Čurn, V. a kol., 2014. Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.). Certifikovaná metodika. ZF JU České Budějovice.