

J I H O Č E S K Á U N I V E R Z I T A
V Č E S K Ý C H B U D Ě J O V I C Í C H
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby



Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

**Využití techniky AFLP fingerprintingu ve šlechtění
řepky**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor:

Bc. Petra Cuřínová

České Budějovice

2008

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Využití techniky AFLP fingerprintingu ve šlechtění řepky“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu této diplomové práce.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 25.4.2008

Petra Cuřínová

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat Prof. doc. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady, které mi poskytl nejen při zpracovávání diplomové práce, ale hlavně během celého studia. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat všem studentkám z Biotechnologického centra při ZF JČU za obětavou pomoc při technické realizaci pokusů.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Původ řepky	2
2.2 Historie šlechtění řepky.....	2
2.3 Cíle šlechtění řepky	3
2.4 Obsah látek v semeni.....	4
2.5 Význam molekulárních markerů ve šlechtění	4
2.6 Molekulární markery	5
2.6.1 Metody založené na restričním štěpení a následné hybridizaci	6
2.6.2 Metody založené na PCR	7
2.6.2.1 PCR.....	7
2.6.2.2 RT-PCR	9
2.6.2.3 Real time PCR.....	9
2.6.2.4 RAPD	10
2.6.3 Techniky využívající kombinaci metod založených na PCR a restričním štěpení a hybridizaci.....	10
2.6.3.1 PCR-RFLP	10
2.6.3.2 VNTRs	11
2.6.3.3 SSR- mikrosatelity	11
2.7 AFLP.....	12
2.7.1 Princip metody AFLP	12
2.7.2 Výhody a nevýhody metody AFLP a její využití	14
3. Materiál a metody.....	16
3.1 Materiál	16
3.2 Metody	18
3.2.1 Izolace genomové DNA pomocí (Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitex).....	18
3.2.2 Izolace DNA s použitím NukleoSpin (R) Plant II (MN).....	18
3.2.3 Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992).....	19
3.2.4 Izolace metodou CTAB s PVP (modifikovanou podle Williamse a Rogerse) ..	20
3.2.5 Měření koncentrace DNA pomocí Qubit TM Fluorometer	21
3.2.6 AFLP.....	21
3.2.7 Příprava agarózového gelu	24
4. Výsledky	26
5. Diskuze.....	32
6. Závěr	34
7. Seznam použité literatury	35
8. Seznam použitých zkratk	39

1. Úvod

Řepka se v současné době řadí mezi sedm nejvýznamnějších olejnin pěstovaných ve světě. Podle serveru Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin byla celková produkce řepky v České Republice v roce 2007 přes 1 milion tun. Význam této olejliny spočívá hlavně v obsahu oleje, který je výchozí surovinou pro celou řadu výrobků, biomasa se spotřebovává jako zelené krmení, či hnojení. Řepka je dále výbornou předplodinou pro obiloviny a v neposlední řadě je potravinářskou surovinou, která slouží k lidské výživě.

Pro dosažení maximálních výnosů (nad 4t/ha) a požadované kvality řepkového oleje (48%) je zásadní výběr vhodné odrůdy. Šlechtění řepky je dlouhodobý proces, který zahrnuje složitou výběr rostlin s vhodnými vlastnostmi. Z těchto důvodů je velmi přínosné využívání (aplikování) molekulárních markerů ve šlechtění řepky. Obecně se pomocí molekulárních markerů dají detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy/ populacemi/ klony/ jedinci/ buňkami a jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Molekulární markery jsou ve šlechtitelských programech využívány při sledování určitých genů v průběhu šlechtitelského procesu pomocí různých metod molekulární biologie. Dále slouží např. pro genetické mapování, populační genetiku a při studiu evoluce.

Metoda AFLP se obecně používá při šlechtění některých jiných druhů plodin než u řepky, u které není zatím tak rozšířená. Technika AFLP se vyznačuje vysokou schopností detekce mnoha polymorfních markerů na jeden vzorek. AFLP markery se dají využít zejména pro molekulární charakteristiku a hodnocení genetické diverzity odrůd řepky. Cílem této diplomové práce bylo využití této techniky ve šlechtění řepky a porovnání původu českých, slovenských a německých odrůd mezi sebou.

2. Literární přehled

2.1 Původ řepky

Řepka olejná (*Brassica napus L. var. napus*) je řazena do rodu brukev (*Brassica*) a spolu s dalšími asi 170 rody a 2000 druhy do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) (Diepenbrock et al. 1999). Řepka je amfitetraploid s 38 chromosomy, který vznikl spontánním zkřížením brukve zelné (*B. oleracea*) s 20 chromozómy a brukve řepice (*B. campestris*) s 18 chromozómy. Genom řepky je tedy složený z obou těchto genomů a řepka má genom AACC. Řepka je autofertilní, i když je odvozená z diploidních inkompatibilních druhů (je znemožněno opylení vlastním pylem). Příčinou autofertility řepky mohou být defektní alely S – lokusu v genomu A i C (U, 1935).

Je převážně samosprašná, ale s vysokým podílem cizosprašení (30-40%), což závisí i na aktivitě včel, na povětrnostních podmínkách v době kvetení i na genetické dispozici (Chloupek, 1995).

2.2 Historie šlechtění řepky

Počátky šlechtění v Československu se datují do období první republiky. Význam řepky v té době byl jen malý. Výběrem z těchto domácích krajových odrůd vznikly ozimé řepky Třebíčská krajová (šlechtitelská stanice ve Stránecké Zhoří okr. Žďár nad Sázavou, povolena v roce 1941), Slapská (šlechtitelská stanice Slapy u Tábora, povolena 1946) a jarní řepka Česká krajová (šlechtitelská stanice Chlumeck nad Cidlinou, povolena v roce 1949). Všechny tyto odrůdy se udržely v sortimentu až do nástupu „bezerukových“ odrůd v 80. letech (Vašák et al., 2000).

Od roku 1960 se prováděly práce v oblasti šlechtění řepky na zlepšení zimovzdornosti rostlin a nepukavosti šešulí, možném snížení obsahu kyseliny erukové (KE). Na přelomu 60. a 70. let byly prováděny úvodní studie ve směru využití heteroze u řepky. Počínaje rokem 1985 byl zahájen výzkum autoinkompatibility u ozimé řepky. Na přelomu 80. a 90. let byly rozpracovány tyto směry šlechtění řepky: 00 typy, E0 typy, typy se změněnou skladbou mastných kyselin, žlutosemenné typy, linie s nízkým obsahem glukosinolátů (GSL) skládajících se zejména ze sinapinu a progoitrinu.

V roce 1983 byla povolena první československá odrůda ozimé řepky **Silesia** s minimálním obsahem KE. V roce 1990 byla povolena první československá odrůda „00“ typu **Sonáta** (restringována v roce 1995), v roce 1993 **Aglona** a v roce 1997 **Odila**.

Šlechtění typu E0 (vysoký obsah KE a nízký obsah GSL) vyústilo do povolení nové české odrůdy **Oáza** registrována v roce 1997 pro průmyslové účely, která se v současné době ale nepoužívá.

Ve Slapech u Tábora začali pracovat s materiály ozimé řepky z táborského okolí. Slapským šlechtitelům se podařilo získat ozimou řepku **Slapská** (povolena v roce 1946), výnosná, olejnatá, zimovzdorná, s dobrým zdravotním stavem i kratší vegetační dobou. V roce 1978 byla povolena odrůda ještě tradičního typu **Mira**. V roce 1986 byla povolena zatím ještě odrůda jednonulová **Solida**, a v roce 1996 již první dvounulová odrůda **Slapská Stela** (obsah KE 2%, obsah GSL 25 mMol/g semene). To umožnilo podstatně širší užití řepkových extrahovaných šrotů jako hodnotného bílkovinného krmiva (Agritec.cz, 2008).

Koncem 90. let minulého století byly do registračního řízení přihlášeny a do Státní odrůdové knihy zapsány první hybridní odrůdy řepky ozimé. Registrovaní hybridi byly založeny na bázi CMS (cytoplazmatická samčí sterilita) - systém ogu/INRA pro tvorbu pylově sterilních hybridů čili komponentních odrůd a na bázi MSL (samčí sterilita), což je systém německé firmy Norddeutsche Pflanzenzucht H. G. Lembke pro tvorbu pylově fertálních (restaurovaných) hybridů (Vašák et al., 2000).

2.3 Cíle šlechtění řepky

Stávající šlechtitelské cíle jsou u řepky definovány následujícím způsobem:

- výnos nad 4 t/ha semen
- zimovzdornost
- zdravotní stav – odolnost proti houbovým chorobám: fomové černání stonku (*Phoma lingam*), hlízenka obecná (*Sclerotinia sclerotiorum*)
- šlechtění na kvalitu semen
- nízký obsah progoitrinu (glukosinolát ze skupiny alkenylglukosinolátů)
- průzkum variability obsahu indolylglukosinolátů a obsahu celkových glukosinolátů (Agritec.cz, 2008)

2.4 Obsah látek v semeni

Nejprve se pěstovaly odrůdy řepky s vysokým obsahem KE a vysokým obsahem GSL. V 70. a 80. letech se začaly pěstovat odrůdy se sníženým obsahem KE ale nesníženým obsahem GSL tzv. „0“ odrůdy. Pak následovaly „00“ odrůdy se sníženým obsahem KE do 2% a GSL do 25 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ semene. V současnosti je vypracováno několik programů na šlechtění tzv. „000“ žlutosemenné řepky s minimálním obsahem KE a sníženým obsahem GSL a se sníženým obsahem vlákniny v semeni z cca 12 na 6 %, dále se pracuje na „0000“, kde je redukován i obsah nestabilní kyseliny linolenové. Dochází ale k rozporů s požadavky lékařů, kteří se spíše přiklánějí ke zvýšení obsahu této esenciální kyseliny (Baranyk, 2007).

Obsah kyseliny linolenové je z hlediska zpracovatelského průmyslu nežádoucí pro její snadnou oxidovatelnost způsobující žluknutí. Z hlediska nutričního má být pro zdravou rovnováhu zachován poměr mezi polynasycenými kyselinami omega 6 (linolová) : omega 3 (linoleová) 5:1 až 9:1 (Vašák et al., 2000).

V omezeném rozsahu se začaly pěstovat i odrůdy „EO“ s vysokým obsahem KE nad 50% a sníženým obsahem GSL pro průmyslové účely. Jejich pěstování je však diskutabilní, protože je velmi těžké zabezpečit důkladnou izolaci od odrůd pěstovaných pro potravinářské účely. Důvodem jsou oprávněné obavy, že by při dnešním širokém rozsahu pěstování bezerukových řepok došlo ke sprášení a výraznému zhoršení její kvality a tudíž i neprodejnosti. V poslední době už vývoj pokročil až k transgenním neboli geneticky upraveným odrůdám s geny rezistence proti herbicidům (Baranyk, 2000).

2.5 Význam molekulárních markerů ve šlechtění

Pomocí DNA markerů lze detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy/populacemi/klony/jedinci/buňkami. DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány např. pro DNA fingerprinting při zjišťování genetické čistoty osiva, ale i pro testování otcovství, sledování určitých genů během šlechtitelských programů (např. SLG geny), genetické mapování, populační genetiku a při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické analýzy, řešení taxonomických otázek).

Molekulární markery mohou být spolehlivě používány jako potenciální techniky pro identifikaci odrůd. Ve srovnání s morfologickými znaky mají molekulární markery mnoho výhod. Jejich exprese (projev) není závislá na podmínkách prostředí, není nutný zdlouhavý výzkum metod pěstování rostlin a potenciální počet markerů je skoro neomezený vzhledem

k isoenzymům. Molekulární markery se úspěšně aplikovaly při registraci a identifikaci odrůd (Mailer et al., 1994) nebo při kontrole čistoty osiva u hybridních odrůd (Marshall et al., 1994).

Další výhodou molekulárních i biochemických markerů bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu, tento proces je nedestruktivní, tj. pro analýzu se používá jen malá část rostlinné tkáně. Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým klasickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků. Navíc velmi často je možné testovat rostliny v klíčném stavu (Moore a Collins, 1983).

DNA markery jsou využívány v oblasti hodnocení genetické diverzity v rámci populace, mezi geograficky odlišnými populacemi, jsou používány ke studiu genetické variability populací planých a kulturních druhů rostlin, hodnocení diploidních a polyploidních druhů.

2.6 Molekulární markery

DNA markery jsou markery na úrovni DNA. Umožňují jednoduše detekovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markerovací systémy jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců (populací) (Čurn, 1998). Je prokázáno, že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (Chloupek, 1995).

DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA. Molekulární markery mají díky fyzikálním vlastnostem DNA několik výhod. Zaprvé, DNA můžeme získat nejenom ze živých, ale i z mrtvých tkání (v případě rostlin z herbářových položek). Molekula DNA je natolik stabilní, že může být zachována i po dobu několika milionů let. Další výhodou jsou malá množství DNA, jež jsou většinou k analýzám zapotřebí. DNA markery se mohou použít také i u velmi raných ontogenetických stádií, což efektivně urychluje práci především ve šlechtitelské oblasti (Cano et al., 1993).

Sekvence DNA se v genomu mohou vyskytovat jako jedinečné sekvence (single copy), jako středně nebo vysoce repetitivní (opakující se) sekvence s rozličnou funkcí a významem, tj. kódující, regulační a nekódující sekvence. Úroveň variability je určována řadou faktorů, např. frekvencí mutací, frekvencí rekombinací, různými formami selekce. V polymorfních regionech se můžeme setkat se dvěma typy variability – s jednoduchými substitucemi nukleotidů nebo s variabilitou v počtu tandemových opakování v repetitivních lokusech (VNTR). Zdrojem variabilních DNA oblastí je více – studium je zaměřeno na rDNA (ribozomální DNA), tDNA (tRNA), minisatelity (repetitivní sekvence 10-30bp dlouhé lokalizované poblíž telomér), mikrosatelity (1-4 bp dlouhé tandemově opakované

nukleotidové sekvence). Kromě tohoto typu polymorfní DNA jsou v genomu obsaženy náhodné genomické sekvence většinou používané v RFLP a RAPD analýzách (Bachmann, 1992).

Princip molekulárních markerů je založen na :

1. specifickém restričním štěpení analyzované DNA a následné hybridizaci se značenou sondou
2. amplifikaci specifických fragmentů v *in vitro* podmínkách
3. na různých kombinacích restričního štěpení, hybridizace a amplifikace.

2.6.1 Metody založené na restričním štěpení a následné hybridizaci

2.6.1.1 RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů

Na základě metody RFLP se identifikují alely podle přítomnosti nebo absence specifického restričního místa. Tato metoda je založená na restričním štěpení genomové DNA pomocí restričních endonukleáz, elektroforetické separaci štěpů a hybridizaci se specifickou sondou (Southern blot). Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizací lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restričních fragmentů DNA (Cano et al., 1993).

RFLP markery jsou založeny na změnách v sekvencích DNA, ke kterým docházelo během evoluce. Tyto změny způsobují bodové mutace v místě štěpení restričními enzymy, inserce nebo delece mohou být výsledkem nerovnoměrného crossing overu v rámci určitého chromozómu. Metoda RFLP byla poprvé použita u rostlin ke konstrukci genetických map (Řepková a Relichová, 2001).

Restriční endonukleázy jsou enzymy, které se specificky váží na DNA a dokáží jí rozštěpit ve specifických místech nacházejících se uvnitř a nebo blízko rozpoznávací sekvence nukleotidů. Tyto enzymy jsou rozděleny do třech skupin: I, II, III. Metoda RFLP využívá restričních endonukleáz typu II, které se specificky váží na DNA. Rozpoznávací sekvence jsou dlouhé čtyři, pět nebo šest nukleotidů a jsou oboustranně symetrické (palindrom). Je jich známo 3000 a tvoří 250 restričních míst. Některé restriční endonukleázy mohou mít i delší nebo degenerované rozpoznávací sekvence (rozpoznávají

více různých nukleotidů). Restrikční enzymy štěpí dvěma různými způsoby: rozštěpí obě vlákna ve stejném místě (tzv. tupé konce) a nebo štěpí každé vlákno v jiné poloze (tzv. kohezní konce) (Cano et al., 1993).

Po restrikčním štěpení genomové DNA se provádí Southern blot (přenos), který spočívá v technice přenosu DNA na membránu, pak následuje hybridizace endonukleázou rozštěpené genomové DNA, která je posléze rozdělena elektroforézou na agarózovém gelu a přenesena z gelu na nitrocelulóзовý nebo nylonový filtr. Vlastní hybridizace se provádí s radioaktivně nebo neradioaktivně značenou sondou v roztoku. Poté následuje vizualizace pomocí autoradiografie. Při použití neradioaktivně (chemiluminiscenčně) značené sondy, je možná přímá vizualizace. Metoda informuje o přítomnosti úseků DNA homologních se sondou a přibližně i o jejich počtu (Ondřej a Drobník, 2002).

RFLP analýza je závislá na dostupnosti specifických sond. Tyto sondy musí být vybírány s ohledem na dostatečný polymorfismus cílových míst a jednoznačnost hybridizace. RFLP markery na jaderné DNA vykazují kodominanci a jsou využívány pro genetické analýzy určování otcovství tzv. „fingerprinting“ a pro tvorbu genetických map významných hospodářsky využitelných plodin. Širšímu využití RFLP na nukleární DNA ve fylogenetických studiích většinou brání jejich pracnost, časová a finanční náročnost (Bachman, 1992).

2.6.2 Metody založené na PCR

2.6.2.1 PCR

Polymerase Chain Reaction - polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR byla popsána v roce 1984 (Saiki et al., 1985). Zavedení a rychlý rozvoj této techniky na přelomu 80. a 90. let minulého století výrazně zjednodušil řadu protokolů používaných v molekulární biologii. PCR umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA v libovolném množství *in vitro*, což je jednou z jejích výhod (Šmarda et al, 2005).

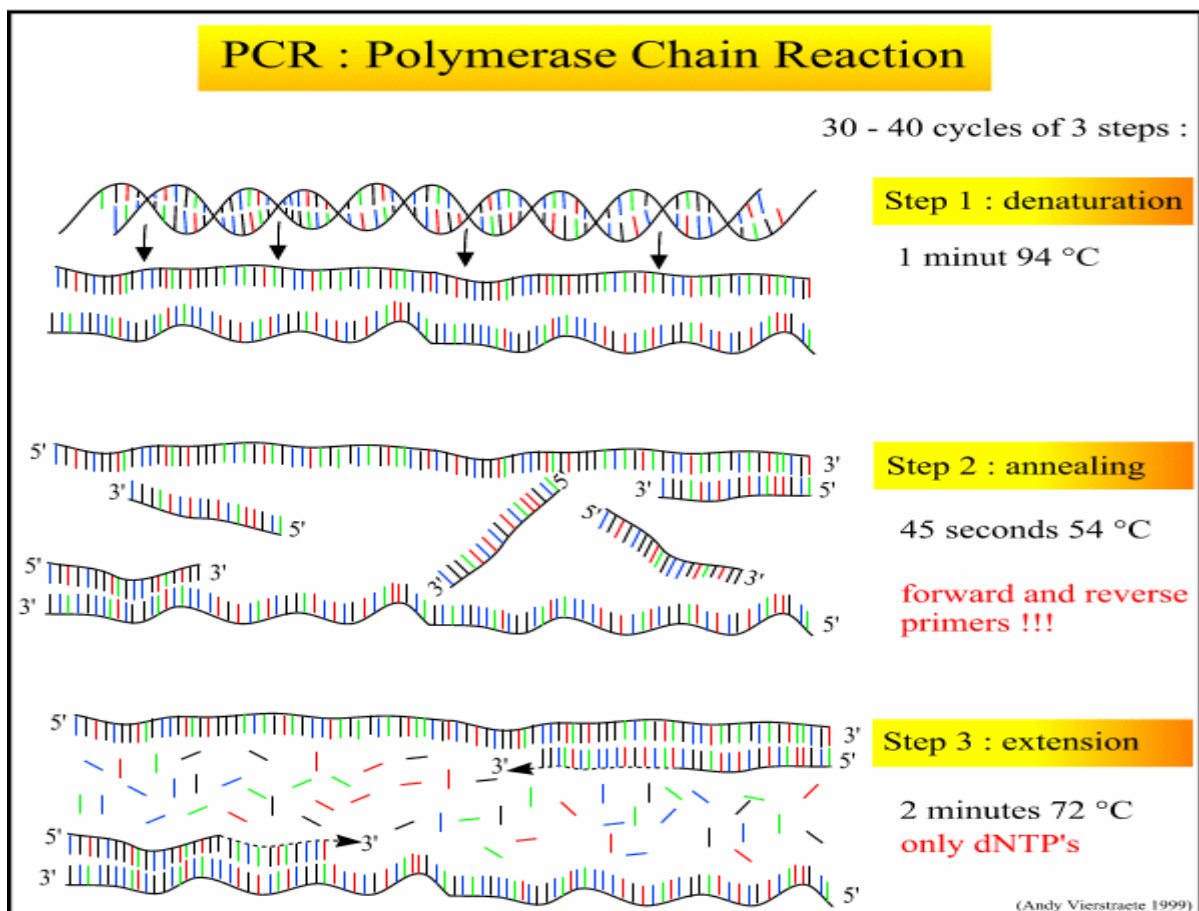
Principem této metody je amplifikace úseku jaderné DNA, pokud známe nukleotidové sekvence ležící v blízkosti naší cílové oblasti – tzv. primery. Primery jsou uměle nasyntetizované oligonukleotidy (10-30 bází dlouhé), které jsou komplementární k sekvencím *dsDNA*. Při PCR se cyklicky opakuje enzymová syntéza nových řetězců úseků *dsDNA* ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA- polymerázy. Úsek nukleotidové

sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě. Po přidání DNA- polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou řetězcích proti směru. K syntéze DNA se používá většinou *Taq* DNA- polymeráza, která byla poprvé izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* v roce 1968 Thomase D. Brockem. Je specifická tím, že odolává vysokým teplotám, při nichž už DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu a fragmenty DNA se množí exponenciální řadou:

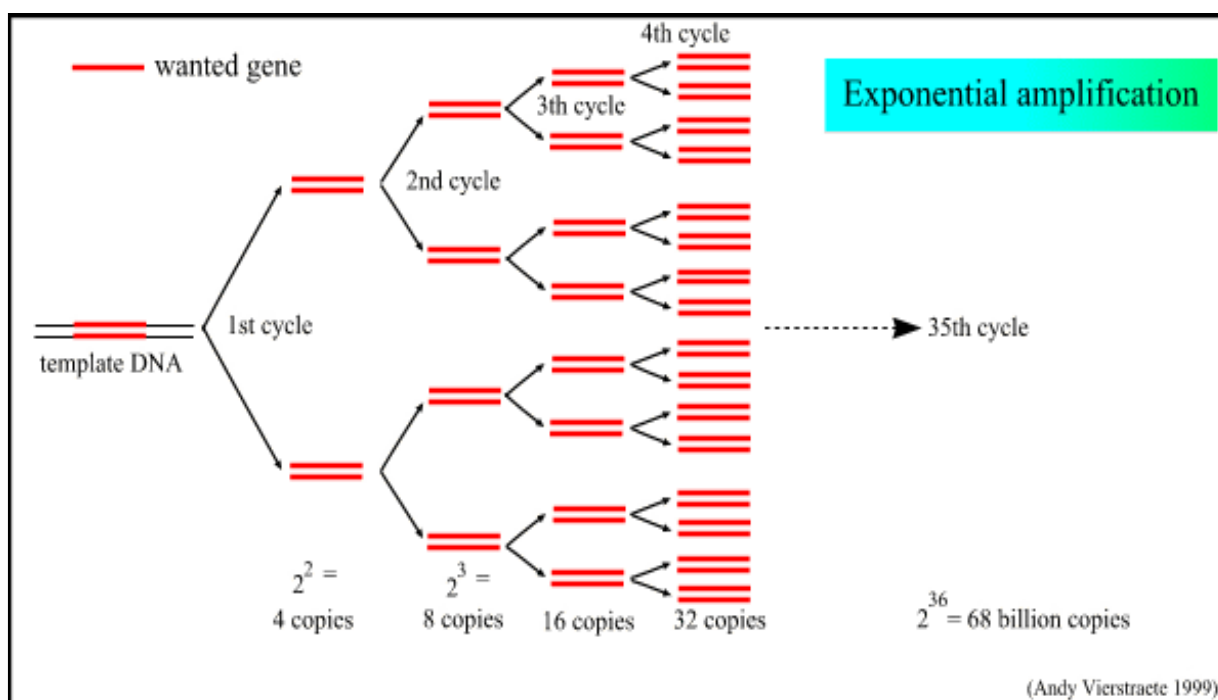
- ⇒ denaturace dvouřetězcové DNA při teplotě 94°C,
- ⇒ annealing (neboli nasedání) primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C),
- ⇒ syntéza nových řetězců DNA za použití DNA-polymerázy (65-75°C)

Tento proces se cyklicky opakuje 30-50x.

Obrázek č. 1: Princip polymerázové řetězové reakce



Obrázek č. 2 Exponenciální nárůst amplifikovaného genu



Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp. Po skončení PCR reakce se amplifikovaná DNA detekuje pomocí gelové elektroforézy (Šmarda et al., 2005).

2.6.2.2 RT-PCR

Reverse transcription PCR = zpětná (reverzní) transkripční polymerázová reakce

Metoda určená pro amplifikaci molekul RNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Nejdříve je molekula RNA přepsána na cDNA (copyDNA) pomocí transkriptázy a následně amplifikována jako molekula DNA v běžné PCR.

2.6.2.3 Real time PCR

Metoda PCR v reálném čase. Amplifikace probíhá obvyklým způsobem jako standardní PCR. Reakční směs obsahuje kromě dvojice primerů ještě specifickou vnitřní sondu (*TaqMan* sonda), která je fluorescenčně značená na 3' konci tzv. zhášečem a na 5' konci tzv. reportérem (Ovesná a Drašarová, 2001). Pokud amplifikace neprobíhá, je energie

vyzařovaná reportérem, pohlcována zhášedčem. V případě amplifikace dojde k rozštěpení vnitřní sondy, reportér se dostane z dosahu zhášedče a uvolněný fluorescenční signál je zaznamenán přístrojem.

Tato metoda se využívá zejména ke kvantitativnímu PCR pro zjištění množství transgenů v biologickém materiálu nebo pro posouzení stupně napadení hostitele patogenem.

2.6.2.4 RAPD

Randomly Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA

Tato metoda patří mezi PCR techniky a poprvé byla publikována v roce 1990. Vytváří produkty, pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA (Williams et al., 1990). RAPD (někdy označována jako AP-PCR= Arbitrarily Primed PCR) používá jeden nebo více krátkých primerů o délce 8-12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro připojení primeru. Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích DNA. Obvykle se vyskytne několik míst, která nejsou od sebe příliš vzdálená a umožňují připojení primerů na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě. Výsledkem bude celá velká skupina amplifikovaných fragmentů, které se pak dále rozdělí na elektroforéze a vytvoří elektroforetický obraz charakteristický pro daný genom (Ondřej, 1999). Pro RAPD analýzu je vhodné optimalizovat všechny parametry, především koncentraci DNA, koncentraci hořčičných iontů a primerů, podmínky PCR reakce (teplotu annealingu) a typ a množství termostabilní DNA polymerázy (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

Genomy příbuzných, ale často vzdálenějších druhů jsou velmi shodně organizovány. Většina pruhů bývá shodná. Proto je třeba vyhledat primer, který vykazuje různou polohu pruhů u třeba i velmi příbuzných organismů – polymorfismus. Soubor několika takových primerů charakterizuje např. odrůdu velmi přesně (Čurná a Sáková, 1996).

2.6.3 Techniky využívající kombinaci metod založených na PCR a restrikčním štěpení a hybridizaci

2.6.3.1 PCR-RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů u produktů PCR

V některých případech se pro tuto metodu používá anglický název CAPS = Cleaved Amplified Polymorphic Sequences. Metodou PCR-RFLP se zjišťuje sekvenční polymorfismus stejně dlouhých PCR fragmentů. Takto se dají rozlišit různé alely jednoho genu nebo nekódujícího úseku, který se využívá jako marker, např. vnitřní transkribované spacery mezi geny pro ribozomální RNA (ITS). Princip metody PCR-RFLP spočívá v tom, že se pomocí PCR amplifikuje specifický fragment DNA (např. úsek genu), který se dále štěpí restriční endonukleázou. Rozpoznávací místo restriční endonukleázy musí být v místě odlišné nukleotidové sekvence, tak aby od sebe byly odlišeny dva úseky DNA lišící se například pouze v jedné bázi, nebo aby výsledkem byl co nejvyšší polymorfismus. Vznikají fragmenty různé délky, které jsou následně separovány na agarózovém gelu. Pro rozlišení vyššího polymorfismu se někdy používají různé restriční endonukleázy. Vizualizace se provádí pomocí ethidium bromidu. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997). Těto metody se taktéž využívá např. k charakterizaci odlišných S – alel u *Brassica napus*, či k restričnímu štěpení genu *SLG* amplifikovaného pomocí klasické PCR.

2.6.3.2 VNTRs

Variable Number Tandem Repeats – variabilita v počtu tandemových opakování

Genomy některých organismů obsahují velká množství mnohonásobných (tandemových) opakování nukleotidových motivů. Tyto motivy se často nachází v nekódujících oblastech genomů v těsné vazbě se strukturními geny. Podle délky motivu a počtu jeho opakování lze tyto oblasti DNA rozdělit na: 1. satelity – oblasti 10^3 - 10^7 nukleotidů dlouhé, délka motivu 100 a více nukleotidů, 2. minisatelity – 10^2 - 10^5 dlouhé úseky, motiv sestávající z 10-100 nukleotidů a 3. mikrosatelity – délka do 10^2 nukleotidů, motiv 2-6 nukleotidů (Chambers a MacAvoy, 2000). Pro detekci minisatelitů při fingerprintingu je obvykle využívána digesce genomové DNA a hybridizace se značenou sondou.

2.6.3.3 SSR- mikrosatelity

Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats – tandemová opakování krátkých motivů

Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů. Délka motivu je 2-, 3-, 4- nebo 6-bazí. Jsou součástí kódujících i nekódujících částí genomu, obvykle se však tato polymorfní místa vyskytují v nekódující části (Weiseng et al., 1995). Jejich unikátní vlastností je poskytování vysokého stupně polymorfismu, který je způsobený variabilním počtem tandemových repetitiv (obvykle 10-30). Díky metodě PCR a následném vizualizování na polyakrylamidovém gelu (PAGE) může být polymorfismus mikrosatelitů spolehlivě testován.

Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací (Šmarda et al., 2005).

Velkou výhodou této metody je její značná kapacita, tj. možnost současně zpracovávat velké množství vzorků, rychlost a nízká cena (Flegr, 2005).

2.7 AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

Tato metoda by měla být zařazena mezi techniky využívající kombinací metod založených na PCR a restričním štěpení a hybridizaci, ale jelikož je hlavním tématem této diplomové práce, je o ní pojednáno podrobněji.

2.7.1 Princip metody AFLP

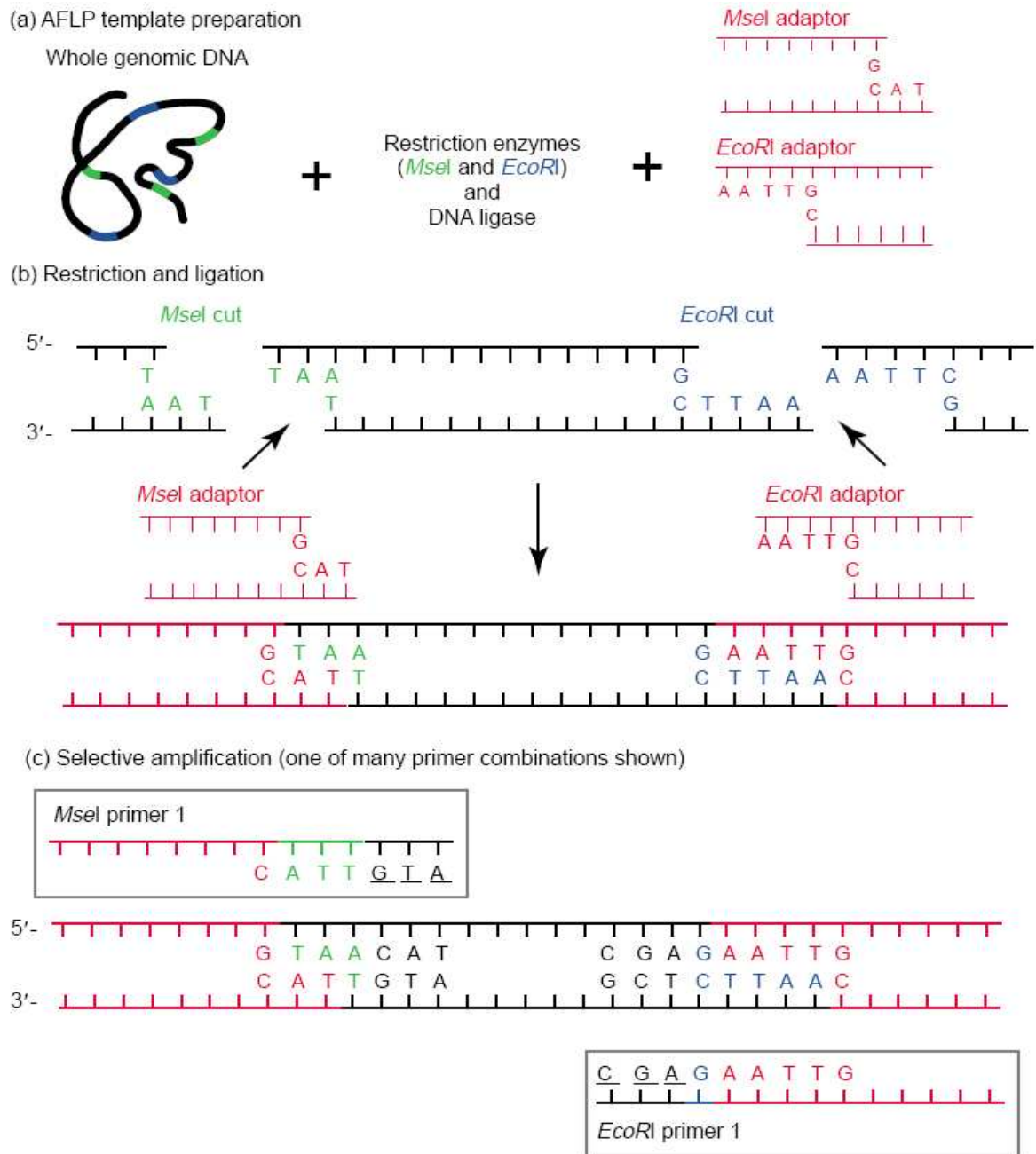
Techniku AFLP poprvé v roce 1995 popsal Vos et al. a je založena na selektivní amplifikaci celkové genomové DNA. Základem této techniky, někdy také označované jako „fragmentová analýza“, je rozštěpení komplexní genomové DNA dvěma restričními endonukleázami, z nichž jedna rozpoznává delší cílové místo a druhá kratší. V dalším kroku se k oběma takto získaných fragmentů připojí dva různé adaptéry, krátké úseky DNA, které se na jednom konci párují s jednořetězcovými úseky DNA vzniklými štěpením jednou nebo druhou endonukleázou a zároveň obsahují každý svou vlastní specifickou sekvenci nukleotidů, která bude následně sloužit k přisednutí PCR- primerů. V dalším kroku se pomocí dvojice specifických primerů amplifikují všechny fragmenty DNA, které jsou na koncích opatřeny touto dvojicí adaptérů. PCR- primery jsou navrženy tak, že se

mohou párovat s nukleotidy adaptérů, a zároveň na svém konci přesahují o jeden nukleotid délku adaptéru, takže se mohou párovat s jedním ze 4 možných nukleotidů fragmentu studované DNA. Díky tomuto přesahu se neamplifikují všechny fragmenty, ale pouze ty, které mají na obou koncích správné nukleotidy. Amplifikuje se tedy v průměru každý 16. fragment. V dalším kroku se tento postup ještě jednou opakuje, ale PCR- primery zasahují o dva nukleotidy hlouběji do nitra amplifikovaných fragmentů a primer, který dosedá na adaptér je fluorescenčně značen. Díky tomu se amplifikuje každý 256. fragment. Zároveň budou fluorescenčně značeny pouze ty fragmenty, které jsou alespoň na jednom konci ohraničeny cílovým místem pro vzácněji štěpící endonukleázu. Následně provedeme elektroforézu v polyakrylamidovém gelu. Díky fluorescenčně značenému primeru můžeme velikost jednotlivých fragmentů zjistit pomocí kapilární elektroforézy v automatickém sekvenátoru (Flegr, 2005).

Princip je založen na selektivní amplifikaci restrikčních fragmentů celého genomu. Postup se skládá ze tří základních kroků: 1. rozštěpení genomické DNA na fragmenty, na něž se nalignují adaptory, 2. selektivní amplifikace fragmentů pomocí speciálních primerů a 3. elektroforéza produktů a počítačová analýza (Vos et al., 1995).

Použitím AFLP je tedy možno vizualizovat sadu restrikčních fragmentů pomocí PCR bez znalosti jejich nukleotidové sekvence. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restrikčních míst a je analogický s polymorfismem RFLP (Šmarda et al., 2005).

Obrázek č. 3 Princip AFLP



2.7.2 Výhody a nevýhody metody AFLP a její využití

Výhodou AFLP je poměrně malý počet primerových párů, které jsou potřeba k vizualizaci velkého počtu lokusů, bez požadavku na znalost sekvence. Dalšími výhodami jsou vysoký stupeň polymorfismu, vysoká spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků a

možnost použití sušeného rostlinného materiálu. Nevýhodami AFLP může být cena a časová náročnost, optimalizace při výběru enzymů a primerů nebo míra podobnosti. Jistým problémem je dominantní charakter AFLP markerů, což neumožňuje rozpoznání heterozygotů. Možnost použití sušeného materiálu, velké množství detekovaných lokusů bez předchozí znalosti sekvencí činí tuto metodu ideální např. pro rozsáhlé populační studie.

Tato metoda se využívá ke zjišťování vnitro- a mezipopulační variability a diverzity, díky vysoké variabilitě a spolehlivosti metody k analýze rodičovství, ve fylogenezi je tato metoda vhodná pro studium vztahů mezi druhy v rámci rodu a při studiu evoluce polyploidů. Metoda se dá využít prakticky u všech organismů nesoucích vlastní DNA zahrnující například bakterie, houby, živočichy (hlístice, členovce, obratlovce) a v neposlední řadě rostliny. Další výhodou této metody je velice rychlá dostupnost získaných dat udávaná velkým počtem polymorfismů na jednu PCR reakci. Výhodné při použití této metody je možnost kombinace 2 odlišných primerů, protože alespoň některý z AFLP markerů se může nacházet ve variabilní oblasti (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

Mezi dostupnými molekulárními DNA technikami je metoda AFLP výkonnou technikou k identifikaci odrůd (Powell et al., 1996). AFLP byla úspěšně aplikována pro intraspecifickou analýzu genetické diverzity u čajovníku (Paul et al., 1997), slunečnice (Hongtrakul et al., 1997) a pšenice (Barret a Kidwell, 1998) a pro vazbu genetického mapování u rýže (Maheswaran et al., 1997).

Metoda AFLP má několik modifikací, jako příklad lze uvést metodu S-SAP (Sequence-Specific Amplified Polymorphism). Tato metoda se využívá pro detekci rozdílů v inzertním místě retrotranspozonů. S-SAP metoda zpravidla vykazuje menší počet fragmentů, ale vyšší stupeň polymorfismu v porovnání s AFLP (Waugh et al., 1997).

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Pro tuto diplomovou práci byly použity soubory českých a československých odrůd a soubor německých odrůd. Čísla v závorce za každou odrůdou značí pořadí vzorků uváděné u obrázků, či ve výsledcích.

České a československé odrůdy: Třebíčská (1), Přerovská (2), Slapská (3), Česká Krajová (4), Valečovská (5), Slovenská Krajová (6), Mira (7), Solida (8), Silesia (9), Sonáta (10), Aglona (11), Omikron (12), Slapská Stela (13), Odila (14), Oponent (15), Opus (16)

Německé odrůdy: Rechbergr Wintergraps (17), Olquel (18), WRG 19 (19), Falkon (20), Zorro (21), Rasmus (22), Orkan (23), Pilot (24), Ramiro (25), Smart (26), Trend (27), Digger (28), Siska (29), Winner (30), Petra (31), Senátor (32)

Osivo odrůd bylo získáno z VÚOL Opava a původ odrůd pak byl získán z databáze EVIGEZ a od p. Ing. Zehnáka z ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou

české odrůdy:

Třebíčská	nejsou dostupné údaje o původu, registrace 1941
Přerovská	nejsou dostupné údaje o původu,
Slapská	nejsou dostupné údaje o původu, registrace 1946
Česká krajová (jarní)	nejsou dostupné údaje o původu, registrace 1949
Valečovská (jarní)	nejsou dostupné údaje o původu
Slovenská krajová	nejsou dostupné údaje o původu
Mira	křížení (Dipee(Oerlikon) x Weilbulls 541) x Vuindeok, registrace 1978,
Solida	křížení:1129/75, 3981, BNW17(NDR), KM2 – náhled. Výběr, registrace 1986
Silesia	kanad.jar.řep. s min. obsahem kys.erukové (x KII.) x CB, registrace 1983
Sonáta	kombinační křížení (Bronowski x Zero) x K 2040 , registrace 1990

Aglona	(Okega x Ledos) x Solux, Opakovaný výběr, registrace 1993
Omikron	n.šl. OKE-2 (křížení kanadské jarní řepky bezerukové s n.šl.K II. a CB, opakovaný individuální výběr
Slapská Stela	Jet Neuf x PNG-14, Křížení, registrace 1996
Odila	(Darmor x R1) x Ceres, Opakovaný výběr, registrace 1997
Oponent	(OP-855 x OP-934) x Lirajet, pylově fertilní linie, registrace 2006
Opus	OP 1412 x Aztec, pylově fertilní linie, registrace 2007

německé odrůdy:

Rechbergrs winterraps	nejsou dostupné údaje o původu
Olquel	nejsou dostupné údaje o původu
WRG 19	nejsou dostupné údaje o původu
Falcon	Ledos x (Rapol x Hector) x Jet Neuf, Křížení, registrace 1993
Zorro	(Bienvenue x Chr. 1775) x (Darmor x NPZ 2/84), Pedigree metoda, registrace 1997
Rasmus	cross 6 rod., zúžená populace, pedigree selekce, registrace 2000
Orkan	Inca x Darmor), Pedigree metoda, registrace 1998
Pilot	PHP 43921 x Ni 18/92 (údaj v žádosti PO), pedigree, pyl. fert. Linie, registrace 2001
Ramiro	(89508 x RG 15) X (Valesca x St. 22/92), Pylově fertilní linie, registrace 2002
Smart	Apex x 88/18888 Hilleshög, pedigree, zúžená populace, registrace 2005
Trend(jarní)	zúžená populace, IRIS x SPONSOR, pedigree, registrace 2005
Digger	materiál firmy KWS, zúžená populace, registrace 2006
Siska	Falcon x Apex, izolované udrž. a množení, registrace 2006
Winner	PHP 92512 x Falkon, Double haploid, registrace 2006
Petra	Amor x St. 140.180, izolace, registrace 2007
Senátor (jarní)	[(Drakkar x Niklas) x Korall], pedigree, zúžená populace, registrace 2005

3.2 Metody

V této diplomové práci byly použity následující metody:

3.2.1 Izolace genomové DNA pomocí (Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitex)

1. 60 mg rostlinného materiálu se zhomogenizuje v tekutém dusíku
2. přidáme se 400 μ l lyzačního pufru P a 20 μ l proteinázy K, zvortexuje se a nechá se 30 min. inkubovat při 65°C
3. lyzační roztok se převede na kolonku, centrifuguje se 1 min. při 12000 rpm
4. k filtrátu se přidá 200 μ l vázacího pufru a důkladně se zvortexuje
5. suspenze se přenesse na kolonku a inkubuje se 1 min. při 12000 rpm, filtrát se slije
6. přidá se 550 μ l promývacího pufru I a centrifuguje se 1 min. při 12000 rpm, filtrát se slije
7. přidá se 550 μ l promývacího pufru II a centrifuguje se 1 min. při 12000 rpm, filtrát se slije, tento krok se opakuje 2x a nakonec se centrifuguje 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění zbývajících ethanolu
8. kolonky s navázanou DNA se dají do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek (mikrozkumavek), přidá se 100 μ l elučního pufru D, který je předehřátý na 65°C, 3 min. se inkubuje, centrifuguje se 2 min. při 12000 rpm

3.2.2 Izolace DNA s použitím NukleoSpin (R) Plant II (MN)

1. Rozdrtí se 100 mg rostlinného materiálu
2. Přidá se 400 μ l roztoku PL1 a 10 μ l RNase A, inkubuje se 10 min. při 65°C
3. Připraví se fialové kolonky, přepipetuje se do nich lyzát. Centrifuguje se 2 min. na 11 000 rpm
4. Filtrát se převede do 1,5 ml mikrozkumavek, přidá se 450 μ l vázacího pufru PC a důkladně se promíchá (nebo se 5x převrátí mikrozkumavka)
5. Směs se převede na zelené kolonky. Centrifuguje se 1 min 11 000 rpm
6. 1. Promývání kolonky 400 μ l PW1 1 min. při 11 000 rpm

7. 2. Promývání 700 µl PW2 1 min. při 11 000 rpm
8. 3. promývání 200 µl PW2 2 min. na 11 000 rpm
9. Eluce - 50 µl PE zahřátého na 70°C. Centrifuguje se 1 min. při 11 000 rpm

3.2.3 Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod, pro účely AFLP analýzy.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniombromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

1. Připraví se roztok 2x CTAB a 1% merkaptoethanolu, na jeden vzorek se počítá 500 µl roztoku. Připravený roztok se dá předeheat na 65 °C.
2. Rostlinná tkáň se může rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud se nepoužívá tekutý dusík dá se do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek rostlinnou tkáň (cca 100 mg), ze které se má izolovat DNA. Pro lepší drcení tkáně se přidá sterilní křemičitý písek.
3. Ke každému vzorku se přidá 500 µl předeheatého pufru, tkáň se rozdrtí a promíchá s pufrem. Nechá se 45 min. inkubovat při 65 °C. Během inkubace se každých cca 15 min. lehce promíchá.
4. Přidá se 500 µl směsi fenol-chloroformu-IAA, nechá se 10 min. protřepávat. Centrifuguje se 5 min. maximální rychlostí 14 000 rpm při pokojové teplotě.
5. Do nových 1,5 ml mikrozkušavek se odpipetuje vodná fáze. Přidá se 500 µl směsi chloroformu-IAA, 10 min. se protřepává. Centrifuguje se 5 min. maximální rychlostí 14 000 rpm při pokojové teplotě.
6. Do nových 1,5 ml mikrozkušavek se přepipetuje vodná fáze. Přidá se 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 µl). Směs se 2–3x lehce promíchá a uloží se na 30 min. do mrazáku (-20 °C). Centrifuguje se 5 min. při 4 °C maximální rychlostí 14 000 rpm.

DNA by se měla zachytit na dně mikrozkušavky. Odstraní se supernatant. Pelet se nechá usušit.

7. Přidá se 300 μ l 1x TE a nechá se 30–60 min. inkubovat při 37 °C.
8. Přidá se 20 μ l 7,5 M octanu sodného a 600 μ l ledového (z mrazáku) 100 % ethanolu. 2–3x lehce promíchat. Vzorky se uloží do mrazáku (-20 °C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky se vyndají z mrazáku a 10 min. se centrifugují maximální rychlostí 14 000 rpm při 4 °C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrozkušavky. Odstraní se supernatant (pipetujeme 2x). Nechá se dobře usušit.
10. Přidá se 400 μ l ledového 70 % ethanolu. 2 – 3x se lehce promíchá. Centrifuguje se 2 min. maximální rychlostí 14 000 rpm při teplotě 4 °C. Okamžitě se odstraní všechny supernatant. Vzorky se nechají dobře usušit (cca 10 min.).
11. Podle množství peletu (DNA) se přidá 20–200 μ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

Pro dokonalé přečištění se může zopakovat postup od bodu 5.

Přidá se 1 μ l Rnázy-A a nechá se 30 min. inkubovat ve 37 °C.

3.2.4 Izolace metodou CTAB s PVP (modifikovanou podle Williamse a Rogerse)

1. Do 1,5 ml mikrozkušavek se naváží 100 mg čerstvého nebo zmraženého rostlinného materiálu, pečlivě se rozdrtí.
2. Přidá se 500 μ l 2x PVP-CTAB + 1% merkptoethanolu předeřhátého na 65°C, směs se 45 min. inkubuje při 65°C.
3. Centrifuguje se 10 min. při 12 000 rpm. Supernatant se přenesse do nových 1,5 ml mikrozkušavek a přidá se 500 μ l chloroformu s IAA (isoamylalkohol), směs se nechá 10 min. promíchávat a následuje centrifugace 5 min. při 12 000 rpm.
4. Vodná fáze se přepituje do nových 1,5 ml mikrozkušavek a přidá se 1/5 celkového objemu vodné fáze 5% CTAB a směs se promíchá.
5. Přidá se 500 μ l chloroformu s IAA a směs se nechá 10 min. promíchat, následuje centrifugace 5 min. při 12 000 rpm.
6. Vodná fáze se přepituje do nových 1,5 ml mikrozkušavek a přidají se 2/3 objemu ledového izopropanolu a směs se lehce 2x-3x promíchá překlopením mikrozkušavek.

7. Směs s izopropanolem se uloží na 30 min. (až noc) do mrazáku (-20°C) (čím delší je doba inkubace při -20 °C, tím vyšší je výtěžnost DNA).
8. Centrifuguje se 5 min. při 12 000 rpm a 4°C. Pomocí pipety se pečlivě odstraní supernatant.
9. Pelet DNA se nechá rozpustit v 300 µl millipore vody (nebo TE pufru) 30-60min při 37°C při stálém míchání.
10. Přidají se 2 objemy 98% ledového ethanolu, směs se 2x-3x promíchá a uloží se na 20 min. až noc do mrazáku (-20°C).
11. Centrifuguje se 10 min při 12000 rpm a 4°C. Supernatant se odstraní.
12. Přidá se 1000 µl 70-80% ethanolu a směs se lehce promíchá.
13. Centrifuguje se 2 min. při 12000 rpm a 4°C. Odstraní se supernatant a pelet se nechá sušit (max 3 hod.).
14. Přidá se 50-150 µl sterilní H₂O (podle velikosti peletu). Nechat rozpouštět 40 min při 37°C. Roztok DNA se skladuje při -20°C.

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5.

Přidáme 1 µl Rnázy-A a necháme 30 minut inkubovat ve 37 °C.

3.2.5 Měření koncentrace DNA pomocí QubitTM Fluorometer

1. připraví se mikrozkušavky – 2 mikrozkušavky pro standard, 1 mikrozkušavka pro každý náš vzorek
2. smíchají se 2 složky z přiloženého kitu, pracovní roztok (*Quant-iTTM Working Solution*) a pufr (*Quant-iTTM buffer*) v poměru 1:200.
3. Příprava standardu: 190 µl pracovního roztoku (*Quant-iTTM Working Solution*) a 10 µl standardu.
Příprava vzorku: 180-199 µl pracovního roztoku (*Quant-iTTM Working Solution*) a 1-20 µl DNA
4. vše se 2-3 s vortexuje a 2 min. se inkubuje v pokojové teplotě
5. koncentrace se měří v QubitTM Fluorometer

3.2.6 AFLP

Pro AFLP analýzu byla vybrána dvojice primerů *EcoRI* ACG a fluorescenčně značený primer *MseI* ACC.

Restrikce genomické DNA a ligace adaptorů (restrikčně ligační krok):

Restrikce (50 µl celkový objem):

40 µl vzorku DNA + 1x R/L pufr, 5 U *EcoRI*, 5 U *MseI*

Na 1 vzorek: 4 µl H₂O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *MseI* = 5 U

(10 µl restrikčního master mixu se přidá ke 40 µl templátu DNA, promíchá se a štěpí se 16 h při 37°C).

Ligace (60 µl celkový objem):

50 µl restrikční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol *EcoRI* 3' adaptor, 5 pmol *EcoRI* 5' adaptor, 50 pmol *MseI* 3' adaptor, 50 pmol *MseI* 5' adaptor, 1,2 pmol ATP, 1 U T4 DNA ligáza

Na 1 vzorek: 1 µl 10x RL pufru, 0,1 µl *EcoRI*-3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 µl *EcoRI*-5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 µl *Mse*-3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 µl *Mse*-5' adaptoru = 50 pmol, 1,2 µl 10mM ATP, 1 µl (1 U) T4 Ligase, 6,2 µl vody

(10 µl ligačního master mixu se přidá k 50 µl restrikční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37°C)

R/L směs se po ukončení ligace naředí 10x T0.1E puftrem (540 µl T0.1E pufru + 60 µl R/L směsi)

Pre-selektivní amplifikace (+1/+1) PCR

Preselektivní amplifikace (50 µl celkový objem):

5 µl vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100), 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 75 ng *EcoRI*-A primeru, 75 ng *MseI*-A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 5 µl vzorku, 5 µl PCR pufru, 2 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP's, 0,15 µl *EcoRI*-A primeru (500 ng/µl), 0,15 µl *MseI*-A primeru (500 ng/µl), 0,2 µl Taq (5 U/), 36,5 µl vody

(45 µl PCR master mixu se přidá k 5 µl vzorku)

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min 94°C
- 30 cyklů:

denaturace	30 s	94°C
annealing	30 s	60°C
elongace	1 min	72°C
- konečná elongace 9 min 72°C
- stop - 4°C

Po ukončení preselektivní amplifikace se 40 µl reakční směsi 20 x naředí (860 µl TE + 40 µl templátu).

10 µl nenaředeného PCR produktu se použije na elektroforézu (0,8% agarózový gel v 1x TBE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 50-500 bází.

Selektivní amplifikace (+3/+3) PCR - SRFA

Selektivní amplifikace (10 µl celkový objem):

2,5 µl vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 5 ng EcoRI-ANN-FAM primeru (fluorescenčně značen), 30 ng MseI-ANN primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 2,5 µl vzorku, 1 µl PCR pufru, 0,2 µl 10 mM dNTP's, 0,087 µl EcoRI-ANN-FAM primeru (10000 pmol), 0,095 µl MseI-ANN primeru (316 ng/µl), 0,1 µl Taq (5 U/µl), 6,018 µl vody
(7,5 µl PCR master mixu se přidá k 2,5 µl vzorku)

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min 94°C
- 10 cyklů:

denaturace	30 s	94°C
annealing	30 s	65°C touchdown (-1°C/cyklus)

elongace	1 min	72°C
➤ 25 cyklů:		
denaturace	30 s	94°C
annealing	30 s	56°C
elongace	1 min	72°C
➤ konečná elongace	15 min	72°C
➤ stop	-	4°C

Příprava vzorků pro fragmentační analýzu

0,5 µl vzorku po selektivní amplifikaci, 0,25 µl standardu, 10,25 µl formamidu
 Separace fragmentů probíhala na genetickém analyzátoru ABI 3130 Applied Biosystems).

3.2.7 Příprava agarózového gelu

1,5 %

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

1,0 %

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

- ⇒ rozvařit v mikrovlnné troubě, nesmí být vidět vlákna
- ⇒ připravit vanu a hřebeny
- ⇒ zchladit (cca 60°C)
- ⇒ přidat EtBr
- ⇒ nalít a odstranit bubliny

Elektroforéza probíhá podle potřeby, obvykle 2 hod při napětí 90 V.

Příprava pufru 5 × TBE (1 l)

Tris 54 g

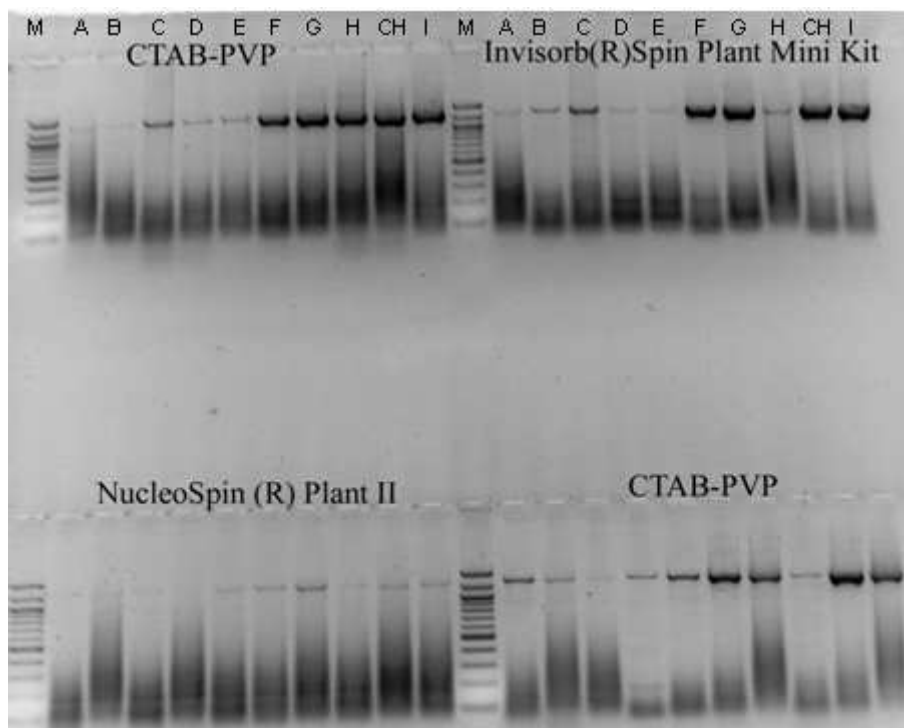
k. boritá 27,5 g

0,5 M EDTA (pH=8,0) 20 ml

4. Výsledky

Pro izolaci DNA je zejména důležitý výběr metodiky postupu izolace. Na obrázku č. 4 je ukázka PCR reakce u deseti odrůd řepky pro porovnání nejvhodnější metody izolace. Pro metodu AFLP je potřeba, aby izolovaná DNA byla vysoké kvality a čistoty. Proto byla zvolena metoda izolace CTAB s PVP (modifikovanou podle Williamse a Rogerse), která je sice časově nejnáročnější, ale pro další aplikace nejvhodnější. Podobných výsledků bylo dosaženo komerčním kitem od firmy Invitek, ale pro metodu AFLP není izolace komerčními kity vhodná kvůli vysokým nárokům na čistotu DNA. Nejhorší výsledky byly zaznamenány při izolaci kitem od firmy Macherey – Nagel.

Obr. č. 4 Ukázka PCR reakce pro porovnání nejvhodnější metody izolace pro následující AFLP analýzu



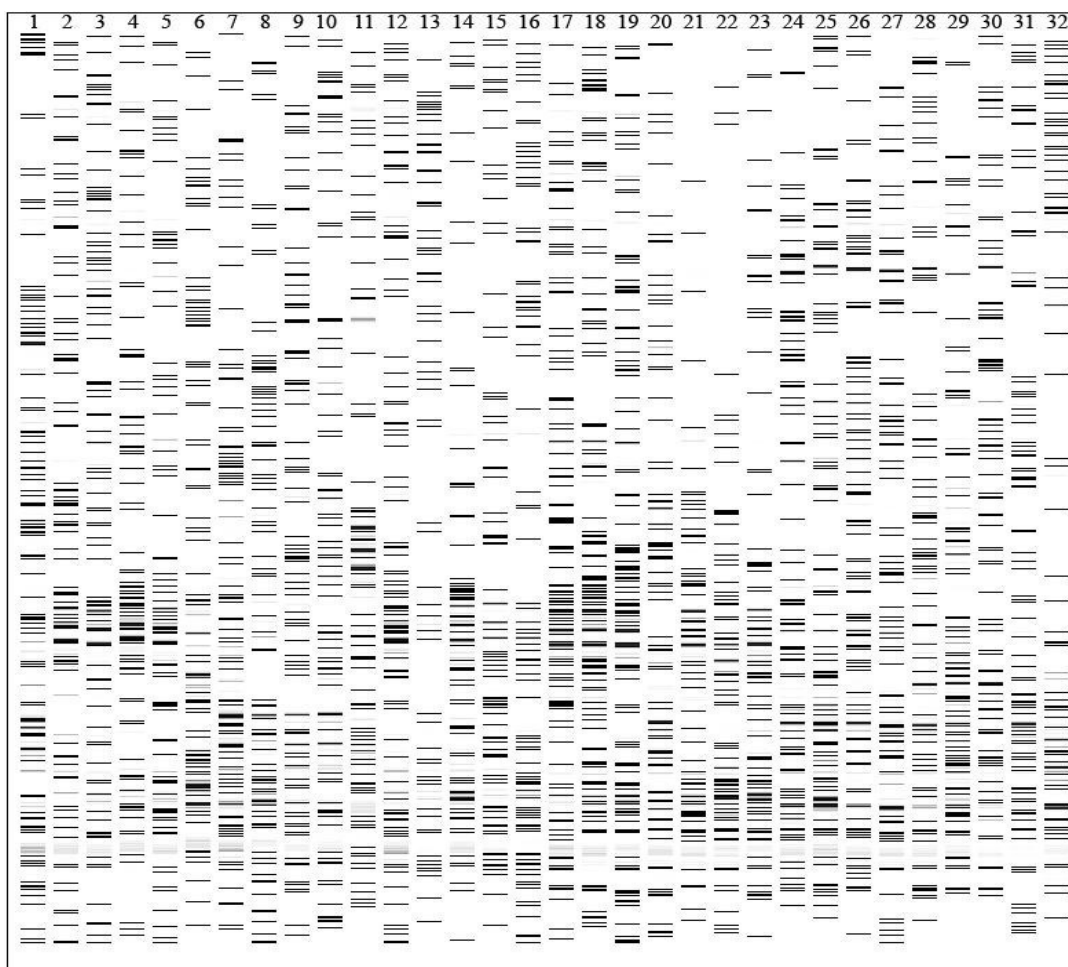
M=100bp Ladder; A= 5972/1; B= 5976/1; C=5977/1; D= 5977/2; E= 5978/1;
F= 6008/1; G= 6009/1; H= 6009/2; CH= 6010/1; I= 6010/2

Koncentrace DNA se následně měřila u čtyř náhodně vybraných vzorků pomocí QubitTM Fluorometru, kterým se zjistilo, že vzorky vykazují dostatečnou koncentraci DNA potřebnou pro analýzu AFLP. Hodnoty koncentrace se pohybovaly kolem 20 $\mu\text{l/ml}$.

Z izolované DNA byla provedena AFLP analýza sloužící k rozlišení podobnosti československých, českých a německých odrůd řepky. Kontrola správně provedené první části AFLP se prováděla tak, že se 10 µl každého vzorku po preselektivní amplifikaci pustilo na 0,8% agarosovém gelu při napětí 90V. Po elektroforetické separaci se velikost amplifikovaných fragmentů na gelu pohybovala v rozmezí 50-500 (600) kb.

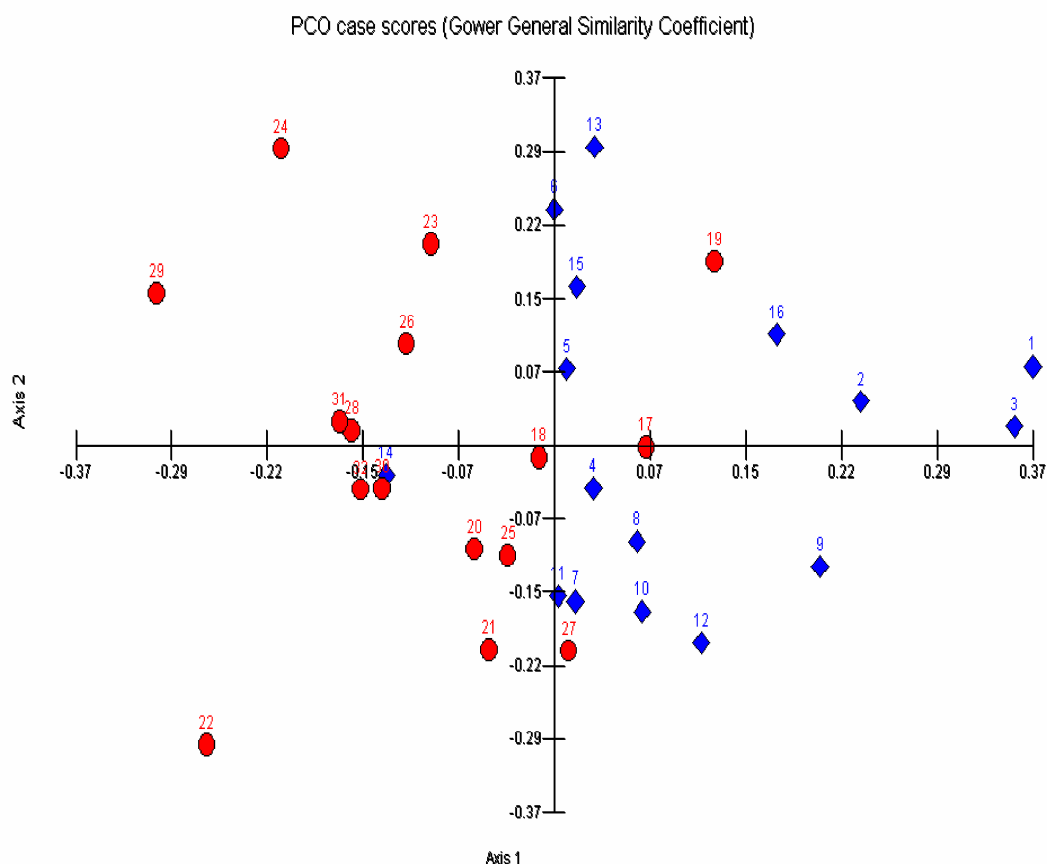
Dále se vzorky z preselektivní amplifikace 20x naředily TE puforem. Do reakce se tedy použilo 2,5 µl z naředěné preselektivní amplifikace. Pokračovalo se selektivní amplifikací za použití dvojice primerů *EcoRI* AGC a *MseI* ACC. Primer *MseI* byl fluorescenčně značen. Po selektivní amplifikaci se vzorky připravily pro fragmentační analýzu, která byla provedena pomocí přístroje Applied Biosystems 3130. Data ze sekvenátoru, která byla analyzována se pro jednodušší vyhodnocení importovala do freeware programu Genographer. Tento program slouží k převedení výsledků z fragmentační analýzy do podoby klasických (výstupů/pruhů) z gelové elektroforézy (obr. č. 5).

Obrázek č. 5 Zdrojový obrázek z fragmentační analýzy po úpravě programem Genographer



Z tohoto zdrojového obrázku byla molekulární data naskórována pomocí programu UltraQuant 6.0. Naskórována byla pouze data se silným signálem (markerem). Pruhy o slabé intenzitě byly z datové matice odstraněny. Následně byla sestavena binární matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhů v dané zóně a provedeno statistické hodnocení. Analýza těchto dat byla provedena specializovaným softwarem MVSP (MultiVariate Statistical Package) sloužící pro výpočet koeficientů genetické podobnosti, koeficientů genetické identity, výpočet genetické vzdálenosti, shluková a koordinační analýza. Na obrázku č. 6 je znázorněn graf, který určuje míru variability u odrůd, které byly použity v této práci. Jestliže se tvoří shluky neboli kompaktní klastr, dá se říci, že v rámci této skupiny jsou si odrůdy navzájem podobné. Odrůdy jsou dobře rozlišitelné podle původu šlechtění. (seznam odrůd a jejich původ uveden v kapitole 3).

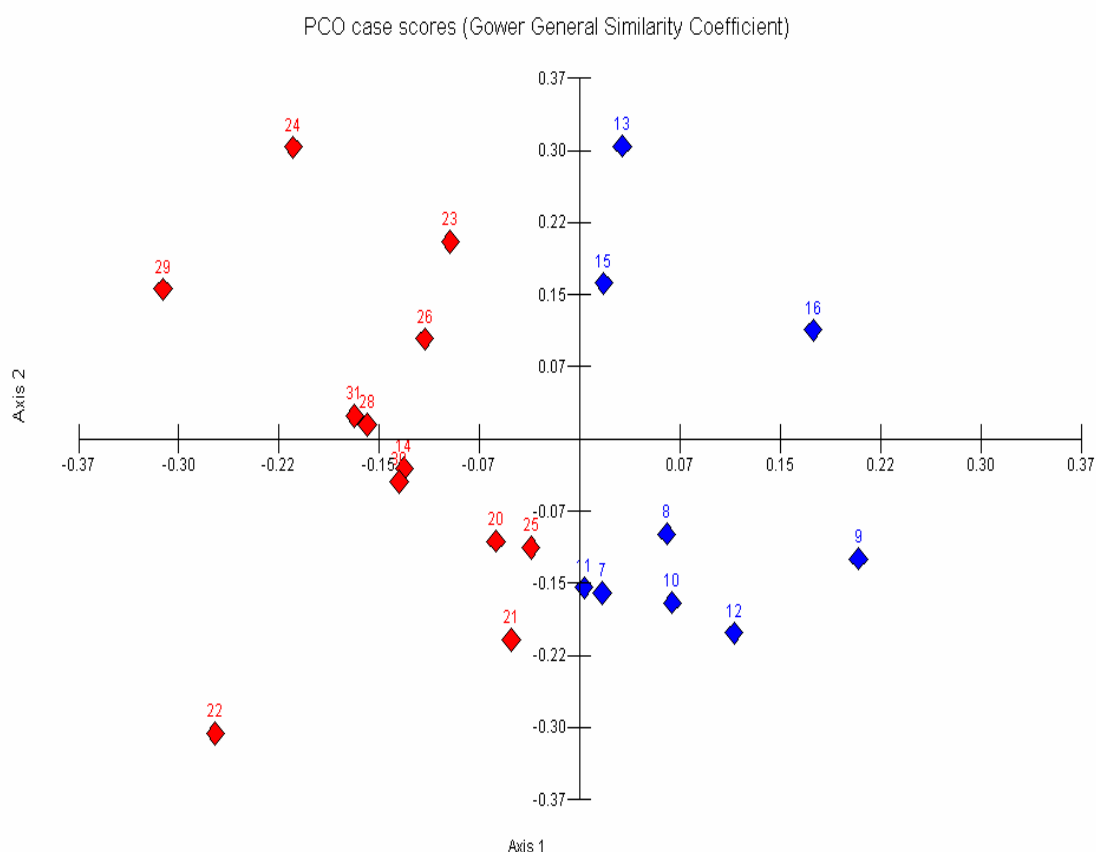
Obrázek č. 6



Modře znázorněny české a československé odrůdy (1-16) a červeně odrůdy německé (17-32)

Z obrázku číslo 6 není přehledně znázorněno, jaká je podobnost mezi odrůdami, proto byl vytvořen další obrázek č. 7, který vychází z korigované matice. Podle dostupných dat o původu a registraci odrůd použitých v této práci, byly záměrně vypuštěny ty odrůdy, u kterých není znám jejich původ a ty, které se řadí mezi jarní odrůdy. Byly vynechány vzorky číslo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18, 19 o neznámém původu a dále odrůdy s jarním charakterem číslo 4, 5, 27, 32. Vzorek číslo 14, odrůda Odila, byla na základě dostupných informací o původu přidělena ke skupině německých odrůd (pochází z křížení německých genových zdrojů).

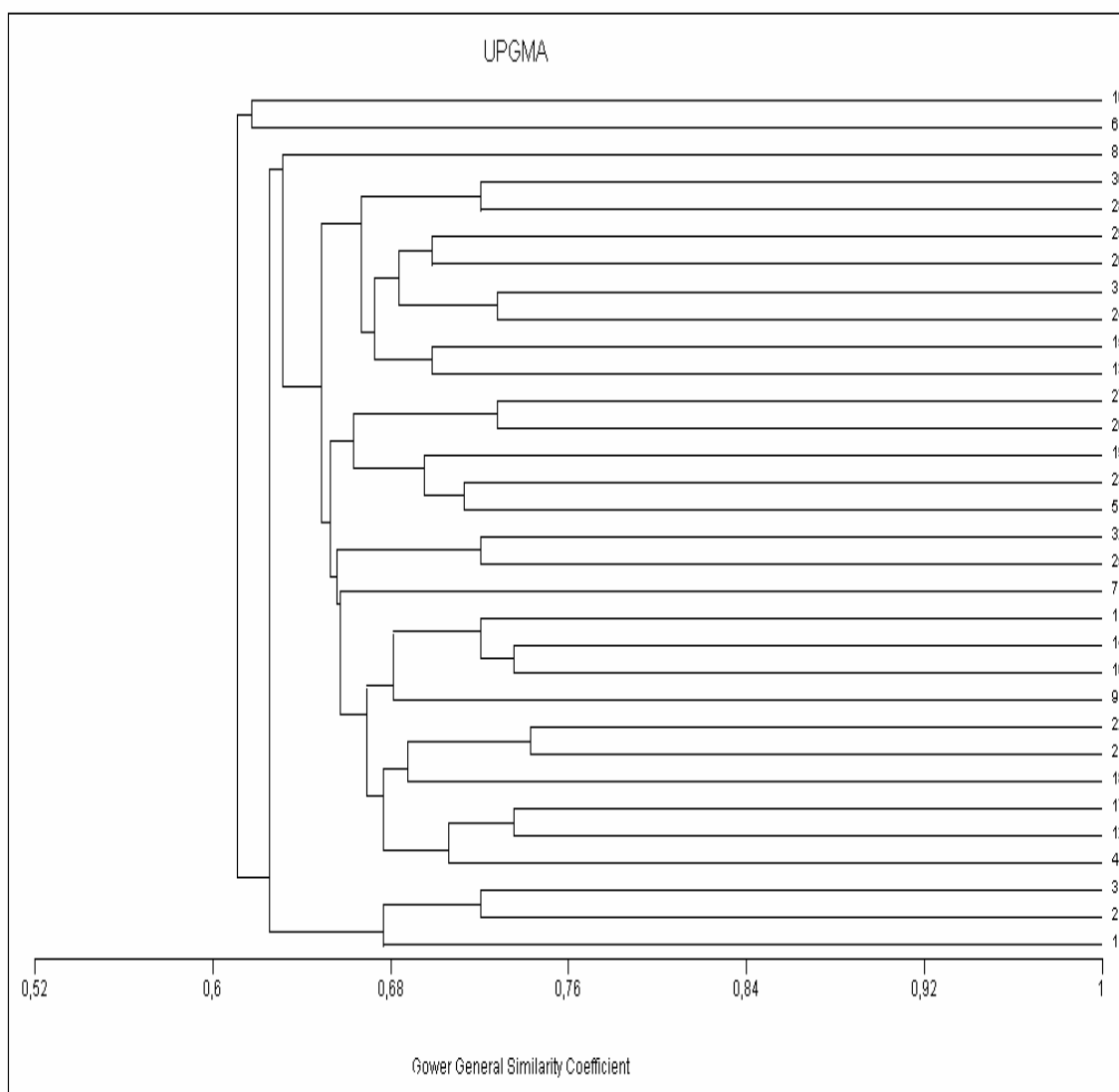
Obrázek č.7



Podle obrázku číslo 7 je zřejmé, že po analýze dat z korigované matice programem MVSP jsou na grafu dobře viditelné 2 klastry (shluky), které názorně rozdělují skupinu odrůd na odrůdy mající původ v českých resp. německých genových zdrojích. Rozdíly v podobnosti mezi českými a německými odrůdami není tak velký, protože se jedná o velmi blízkou oblast pěstování a šlechtění. Výraznějších rozdílů by bylo dosaženo při analýzách odrůd

pocházejících ze vzdálených míst jako by bylo například porovnání odrůd z Japonska s českými odrůdami.

Obrázek č. 8 Shluková analýza UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) všech analyzovaných odrůd



Číslo 1-32 znázorňuje odrůdy, číslo na ose x vyjadřuje koeficient podobnosti

Pomocí shlukové analýzy byl vytvořen kladogram, který udává podobnost jednotlivých odrůd. Kladogram můžeme rozdělit na dvě hlavní větve, které se dále člení na další podle koeficientu podobnosti. Jedna větev nám odlišila dvě odrůdy, které se diametrálně liší od zbývajících skupiny odrůd. Vzhledem k délce obou větví se i přesto dá říci, že jsou odrůdy navzájem podobné.

Odrůdy 1-3 jsou registrované v 50. letech minulého století a není znám jejich přesný původ. Staré krajové odrůdy typu populace s vysokým stupněm cizosprášení, pocházející přibližně ze stejného území, v důsledku čehož mají širokou genetickou základnu, která se jeví jako společná. Odrůda č. 4 Česká krajová má také neznámý původ, ale díky svému jarnímu charakteru se od skupiny odrůd 1, 2 a 3 odlišuje a netvoří společně s nimi klastr. Slovenská krajová s československým původem a další odrůdy s neznámým původem se od liniových odrůd svou podobností liší. Liniové odrůdy vznikají samosprášením nebo inbreedingem za postupného ustálení linie, proto jsou od odrůd krajových vzdálené.

Z německých odrůd se od ostatních liší odrůdy Rechbergrs Winterraps (17) a WRG 19 (19). U odrůd Rechbergrs Winterraps a WRG 19 je udáván původ německý, ale nepodařilo se zjistit jejich přesný rodokmen, z toho se dá soudit, že mohly mít českého předka, proto tak velká podobnost s českými odrůdami. Odrůdy Trend (27) a Senátor (32) patří sice mezi jarní odrůdy řepky, ale nijak se od ostatních německých odrůd neliší.

Z obrázku č. 6 je zřejmé, že odrůdy č. 14, 30, 32 budou mít nejspíše společného předka. Výjimku zde tvoří česká odrůda Odila (14), která má sice původ v ČR, ale vyšlechtěna byla z německé odrůdy Ceres a francouzské Darmor. Podle Českého informačního systému EVIGEZ (Evidence genetických zdrojů rostlin) je šlechtitelem odrůdy Odila (14) Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke a majitelem český podnik OSEVA PRO s.r.o.. Odrůdy č. 30 a 32 mají původ německý, ale není přesněji specifikováno.

5. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo pomocí metody AFLP porovnat původ českých, československých a německých odrůd řepky.

Metoda AFLP se v posledních letech jeví jako velice vhodný nástroj používaný jak v klasickém šlechtění, tak i v pracích studující bakteriální taxonomii (Huys et al. 1996, Janssen et al. 1996), a také pro identifikaci houbových izolátů (Mueller et al. 1996). Zaznamenáno bylo i použití AFLP k analýze odrůd různých druhů jako jsou například obilniny, brambory, slunečnice, brukvovitě, fazole a čočka (Cooke a Reeves, 1998; Law et al., 1998; Lombard et al., 2000; Sobotka et al., 2004). Dále byla AFLP úspěšně aplikována pro intraspecifickou analýzu genetické diverzity u čajovníku (Paul et al., 1997), slunečnice (Hongtrakul et al., 1997) a pšenice (Barret a Kidwell, 1998) a pro vazbu genetického mapování u rýže (Maheswaran et al., 1997).

V této práci byla při provádění metody AFLP použita pouze jedna kombinace primerů a to *EcoRI* AGC a *MseI* ACC a testováno bylo 16 českých a československých odrůd a 16 německých odrůd. Mezi odrůdami se nacházely jak typy jarní tak i ozimé, což bylo zohledněno v konečné fázi vypracování výsledků a jejich následné úpravě. Po celkové analýze a zpracování dat se dá říci, že odrůdy mezi sebou vykazují vysokou podobnost. Podle Lombard et al. (2000) je metoda AFLP velice obstojná k identifikaci odrůd a analýze genetické diverzity u řepky. V jejich práci bylo porovnáváno 83 odrůd jarních a ozimých odrůd řepky se sedmnácti kombinacemi AFLP primerů. Všechny z 83 odrůd byly odlišeny jen dvěma primerovými kombinacemi. Pomocí těchto dvou primerových kombinací odlišily odrůdy Eurol a Idol, zatímco Lee et al. (1996) podle dat z RFLP markeru neuvádí mezi těmito dvěma odrůdami žádné výraznější rozdíly. Sobotka et al. (2004) uvádí, že při využívání AFLP u řepky, vykazuje tato metoda vyšší stupeň polymorfismu a schopnosti rozlišení než metody RAPD a SSR. Pomocí AFLP techniky se podařilo detekovat nejen transgenní rostlinu řepky, ale i příbuzné plané rostliny (Warwick et al. (2003). Zatímco Hansen et al. (2001, 2003) použili tuto metodu k detekci hybridů mezi *Brassica napus* a jejich příbuzenskými vztahy. Oproti tomu Hu et al. (2006) hodnotili genetickou diverzitu u rodu *Brassica napus* pocházejících z Evropy a Číny podle devíti důležitých agronomických vlastností. Mezi agronomické vlastnosti byly zařazeny výška rostlin, počet větví při primárním větvení, poloha první primární větve, mezní délka květenství, počet šesulí na květenství, počet šesulí na rostlinu, počet semen v šesuli, HTS, výnos semen na rostlinu. Jejich výsledky na základě

těchto vybraných agronomických vlastností byly shodné s dostupnými informacemi o rodokmenu a geografickém původu posuzovaných odrůd, stejně jako jejich předešlé výsledky z RAPD analýzy. Naproti tomu jejich závěrečné výsledky se neshodují se zjištěnými poznatky RFLP analýzy, kterou použili Song a Osborn (1992), Diers a Osborn (1994) a Lee et al. (1996). Dále se jejich závěry neshodovaly ani s AFLP fingerprintingem, který ve své práci uveřejnil v roce 2000 Lombard et al.. Hodnocení genetické diverzity u *B. napus* podle agronomických vlastností podle Hu et al. (2006) se dále také liší od výsledků isozymové analýzy poskytnutých od Zhao a Becker (1998). Těm se podařilo rozdělit značné množství ozimých a jarních odrůd řepky do odlišných skupin a naznačili, že genetické pozadí těchto odrůd druhu *B. napus* je rozdílné. Pomocí isozymových markerů také dokázali, že odrůdy pocházející z Číny a Evropy náleží do odlišných genových skupin.

Isozymové analýzy se začalo využívat v 80. letech minulého století jako markerů pro charakterizaci odrůd různých plodin, zahrnujících i řepku (Čurn a Sáková, 1997; Gupta a Röbbelen, 1986; Mündges et al., 1990). Dále bylo využito isozymů jako biochemických genetických markerů pro popis a hodnocení odrůd rodu *Brassica* (Arús et al., 1985; Mündges et al., 1990).

Další metodou, se kterou byla AFLP markerovací metoda porovnávána, byla molekulární data získaná ze sekvencí transkribovaných spacerů ITS (Internal transcribed spacers) v práci Marhold et al., 2004. Práce byla konkrétně zaměřena na porovnání ITS a AFLP analýzy diploidních taxonů řeřišnic z čeledi brukvovitých z úzce příbuzných polyploidních komplexů. Analýzy ITS i AFLP poskytly téměř shodné výsledky v posuzovaných vztazích. Oba použité molekulární markery ukázaly vysokou podobnost v uspořádání taxonů do dvou hlavních klastrů. Pomocí ITS analýzy, což jsou úseky specifické pro malou ribozomální podjednotku, lze odlišit pouze menší taxony v porovnání s AFLP, která je sice nespecifická a není tudíž bezpodmínečně nutné znát sekvence DNA organismu, a přesto lze pomocí amplifikovaných fragmentů odlišit i vzdálenější druhy.

Hale a Farnham (2005) porovnávali mezi sebou tři různé markery: SRAP, AFLP a SSR pro detekci genetických rozdílů v inbredních liniích u brokolice (*Brassica oleracea* var. *Botrytis italica*). Z jejich závěrů vychází, že AFLP dokáže zachytit více polymorfních míst a je tedy mnohem vhodnější pro odlišení posuzovaných vzorků, i přesto, že metoda AFLP je daleko pomalejší, pracnější a finančně náročnější. AFLP v této práci poskytla 20 polymorfních markerů na jednu primerovou kombinaci oproti SSR markeru, kde je polymorfismus zachycen u dvou markerů na primer a u SRAP je to 14 markerů na primer.

Z nalezených informací vychází metoda AFLP jako nejspolehlivější, poskytující nejpodrobnější informace, dovede rozlišit organismy na různé taxonomické úrovni, má však i své nevýhody a těmi jsou pracnost, velká časová a zejména finanční náročnost, vyžaduje lepší vybavenost molekulárních laboratoří a pro vyhodnocení výsledků je zapotřebí automatického sekvenátoru.

6. Závěr

V této práci bylo zjištěno, že je nutné hodnotit skutečný původ odrůdy z pohledu šlechtitelských komponent, tedy podle přesného rodokmenu a ne z pohledu vlastníka odrůdy. Tak tomu bylo například u odrůdy Odila, která se řadí mezi české odrůdy a vlastníkem a udržovatelem je VÚO Opava. Nicméně pro křížení této odrůdy byla použita německá odrůda Ceres a francouzská odrůda Darmor.

Rozdíly mezi studovanými odrůdami sice existují, ale nejsou výrazné a poukazuje to na vysokou příbuznost a zúžení genetické základny genových zdrojů, které jsou používány ke křížení ve střední Evropě.

Pomocí molekulárních markerů lze skupinu českých, československých a německých odrůd majících původ v genových zdrojích z oblasti Německa a České republiky odlišit, i přesto že dochází k častému křížení odrůd mezi sebou. Metodou AFLP tedy lze zachytit i velmi nepatrné rozdíly mezi odrůdami v jejich genetické základně. Dále se potvrdilo, že využití techniky AFLP ve šlechtění řepky se osvědčuje a dostává se jí stále větší a větší pozornosti. Pro další výzkum a podporu této metodiky by bylo zajímavé porovnání daleko rozsáhlejšího souboru odrůd, pocházejících z různých oblastí pěstování ve světě, jako například japonské, čínské, indické, australské, americké, kanadské a různé evropské odrůdy. Tímto způsobem by se jistě dosáhlo mnohem výraznějších rozdílů mezi sledovanými soubory.

7. Seznam použité literatury

Obr.č.1 a 2 = <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Obr. č. 3 = **Mueller U. G., Wolfenbarger LaReesa L.** (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. Elsevier Science Ltd. 14, 389-394.

Internetové zdroje: www.agritec.cz 29.4.2008

www.spzo.cz 29.4.2008

Arús P. (1983): Genetic purity of commercial seed lots. *In* „Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A“ (S.D. Tanksley and T.J. Orton, eds.). Elsevier Science Publication, Amsterdam, Oxford, New York, pp. 415-423.

Baranyk P. (2000): Využití heterozního efektu u řepky ozimé. Habilitační práce. ČZU Fakulta agronomická, Praha.

Baranyk P. (2007): Je řepkový olej kvalitnější než olivový?. *Úroda* 55, 18-19.

Bachman K. (1992): Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. *Acta Botanica Neerlandica* 39, 369-384.

Barret B.A., Kidwell K. (1998): AFLP based genetic diversity assesment aminy wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science* 38, 1261-1271.

Brock T. D., Freeze H. (1969): *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J Bacteriol* 98(1), 289–297.

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

Cano R.J., Poinar H.N., Pieniazek N.J., Acra A., Poinar G.O. (1993): Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million-year-old weevil. *Nature* 365, 536-538.

Cook R.J., Reeves J.C. (1998): Kultivar identification general discussion and review of new methods. *In* „Encyclopedia of Seed Production of World Crops“ (A.F. Kelly and R.a.T. Georgie, eds.). John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Čurn V., Sáková L. (1997): Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. *Genetika a šlechtění* 33, 281-305.

Čurn V. (1998): Analýzy biochemických a molekulárních markerů u kulturních a planých rostlin. Habilitační práce. JU ZF, České Budějovice.

- Diepenbrock W., Fischbeck G., Heyland K.U., Knauer N.** (1999): Spezieller Pflanzenbau, 3. Aufl., Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Diers B. W., Osborn T. C.** (1994): Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 62-67.
- Gupta S. K., Röbbelen G.** (1986): Identification of rapeseed (*Brassica napus*) cultivars by electrophoresis. *Plant Breeding* 96, 363-370.
- Hansen L.B., Siegismund H. R., Jorgensen R. B.** (2001): Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48, 621-627.
- Hansen L.B., Siegismund H. R., Jorgensen R. B.** (2003): Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and *B. rapa*. *Heredity* 91, 276-283.
- Hongtrakul V., Huestis G.M., Knapp S.J.** (1997): Amplified fragment length polymorphism as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95, 400-407.
- Hu SW., Yu Ch., Zhao H., Sun G., Zhao S., Vyvadilová M., Kučera V.** (2006): Genetic diversity of *Brassica napus* L. Germplasm from China and Europe assessed by some agronomically important characters. *Euphytica* 154, 9-16.
- Huys G., Coopman R., Jansen P., Kersters K.** (1996): High resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 572-580.
- Chambers G.K. and MacAvoy E.S.,** (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126, 455-476.
- Chloupek O.** (1995): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, Academia, Praha, ČR, 186.
- Law J.R., Domini P., Koebner R.M.D., Reeves J.C., Cooke R. J.** (1998): DNA profiling and plant variety registration. III The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphism, *Euphytica* 102, 335-342.
- Lee D., Reeves J.C., Cooke R.J.** (1996): DNA profiling and plant variety registration: 2. Restriction fragment length polymorphisms in varieties of oilseed rape. *Plant Var. Seeds* 9, 181-190.
- Lombard V., Baril C.P., Dubreuil P., Blouet F., Zhang D.** (2000): Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP. Consequences for varietal registration. *Crop Science* 40, 1417-1425.

- Maheswaran M., Subudhi P.K., Nandi S., Xu J.C., Parco A., Yang D.C., Huang N.** (1997): Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a double haploid rice population. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 39-45.
- Mailer R. J., Scarth R., Fristensky B.** (1994): Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics* 87, 853-858.
- Marhold K., Lihova J., Perný M., Bleeker W.** (2004): Comparative ITS and AFLP Analysis of Diploid Cardamine (Brassicaceae) Taxa from Closely Related Polyploid Complexes. *Annals of Botany* 93, 507-520.
- Marshall P., Marchand M.C., Lisieczko Z., Landry B.S.** (1994): A simple method to estimate the percentage of hybridity of canola (*Brassica napus*) F1 hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 783-790.
- Moore G.A., Collins G.B.** (1983): New challenges confronting plant breeders. In „ Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A“ (S.D. Tanksley and T.J. Orton, eds.), pp. 25-58. Elsevier Science Publication, Amsterdam, Oxford, New York.
- Mueller U. G., Lipari S.E., Milgroom M.M.** (1996): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*, *Molecular Ecology* 5, 119-122.
- Mueller U. G., Wolfenbarger LaReesa L.** (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. Elsevier Science Ltd. 14, 389-394.
- Murray M. G., Thompson F. W.** (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 19, 4321-4326.
- Mündges H., Köhler W., Triedr W.** (1990): Identification of rapeseed cultivars (*Brassica napus*) by starch gel electrophoresis of enzymes. *Euphytica* 45, 179-187.
- Nanesen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Marjo, Bleeker, Vos P., Zabeau M., Kersters K.** (1996): Evaluation of the DNA fingerprinting Method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy, *Mikrobiology* 142, 1881-1893.
- Ovesná J. a Drašnarová Z.** (2001): Identifikace transgenů v rostlinách, semenech a odvozených produktech. Osivo a sadba – V. odborný a vědecký seminář, Praha.
- Paul S., Wachira F.N., Powell W., Waugh R.** (1997): Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 255-263.

- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A.** (1996): The comparison of RFLP, RADP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed* 2, 225-238.
- Řepková J. a Relichová J.** (2001): *Genetika rostlin*, MU Brno, ČR, 269.
- Sobotka R., Dolanská L., Čurn V., Ovesná J.** (2004): Fluorescence-based AFLP's occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *Journal of Applied Genetics* 45, 161-173.
- Song K., Osborn. T. C.** (1992): Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analysis. *Genome* 35, 992-1001.
- Vašák J. a kol.** (2000): *Řepka*. Agrospoj Praha, 321.
- Vos, P., Hogers R., Sleeker M, Reijans M, Lee T, Homes M, Freiters A, Pot J. Peleman J, Kuiper M and Zabeau M.** (1995): AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- Warwick S.I., Simard M. J., Hegere A., Beckie H. J., Braun L., Zhu B., Mason P., Seguin-Swartz G., Stewart C. N.** (2003): Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L. and *Erucastrum gallicum* (Wild) OE Schulz. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 528-539.
- Waugh R., Bonar N., Baird E., Thomas B., Graner A., Hayes P., Powell W.** (1997): Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Molecular and General Genetics* 255, 311-321.
- Weiseng K. Atkinson R.G. Gardner R.C.** (1995): Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Meth Applications* 4, 249-255.
- U, N.** (1935): Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and its peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* 7, 389-452.
- 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 Argon Sin* 24, 213-220.

8. Seznam použitých zkratek

AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AG	agarózový gel
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR = jiný název pro RAPD
bp	páry bází, base pairs
cDNA	copy DNA
CMS	cytoplasmatická forma samčí sterility, (Cytoplasmatic Male Sterility)
CTAB	cetyltrimetylamoniumbromid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
<i>ds</i> DNA	dubble stranded DNA, dvouvláknová kys. deoxyribonukleová
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová
Elfo	elektroforéza
Etbr	ethidium bromid
EVIGEZ	Evidence genetických zdrojů rostlin
GSL	glukosinoláty
IAA	isoamylalkohol
ITS	Internal Transcribed Spacers
Kb	kilobáze
KE	kyselina eruková
MSL	Male Sterility Lembke
MVSP	MultiVariate Statistical Package
PAGE	polyakrylamidový gel
PCO	Principle Coordinate Analysis
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PCR-RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů u produktů PCR = CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)
PVP	polyvinyl pyrrolidon
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	ribosomální DNA

RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RT PCR	reverse transcription PCR = zpětná (reverzní) transkripční polymerázová reakce
SLG	S-locus glycoprotein
SRAP	Sequence-related Amplified Polymorphism
S-SAP	Sequence-Specific Amplified Polymorphism
ssDNA	single stranded DNA, jednovláknová DNA
SSR	mikrosatelity- tandemová opakování krátkých motivů (Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats)
Taq	termofilní polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermophylus aquaticus</i>
tDNA	transferová DNA
TE	10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 mM EDTA
TBE	směs 0,089 M Tris Base, 0,089 M kys. Boritá, 0,002 M Na ₂ EDTA
Tris	N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonová kyselina
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
VNTR	Variable Number Tandem Repeats – variabilita v počtu tandemových opakování