



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.**

## **Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.)**

**Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu MZe NAZV  
QI 111A075 „Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů  
a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky“**

**Autoři:**

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.,  
Ing. Eva Jozová, Ing. Irena Jelínková, Mgr. Ing. Ondřej Hejna,  
Ing. Vratislav Kučera, CSc., Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.,  
Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.**

**České Budějovice, říjen 2014**



**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta**

**Využití molekulárních technik při selekci  
rodičovských komponent v programech  
hybridního šlechtění řepky (*Brassica  
napus* L.)**

Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu MZe NAZV QI 111A075 „Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky“

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.  
Ing. Eva Jozová  
Ing. Irena Jelínková  
Mgr. Ing. Ondřej Hejna  
Vratislav Kučera, CSc.  
Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.  
Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.**

**České Budějovice, 2014**

Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.)

Vladislav Čurn a kol.  
[vcurn@seznam.cz](mailto:vcurn@seznam.cz)

Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice 2014  
[www.zf.jcu.cz](http://www.zf.jcu.cz), <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory výzkumného projektu MZe NAZV QI 111A075 „Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky“.

Oponenty metodiky byli:

prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc., Mendelova univerzita Brno  
Ing. Petr Zehnálek, ÚKZÚZ ZS Hradec nad Svitavou

Podíl autorů na vypracování metodiky:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D. (30%),  
Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D. (25%),  
Ing. Eva Jozová (10%), Ing. Irena Jelínková (10%), Mgr. Ing. Ondřej Hejna (10%),  
Ing. Vratislav Kučera, CSc. (5%), Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc. (5%), Ing.  
Miroslav Klíma, Ph.D. (5%)

*Text: ©2014 Čurn V. et al.*

*Foto: ©2014 Čurn V.*

Vydáno bez jazykové úpravy

**ISBN: 978-80-7394-504-6**

Obsah:

<b>I. Cíl metodiky</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>3</b>
II.1. Úvod .....	3
II.2. Metodika izolace DNA .....	7
<i>Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA řepky</i> .....	7
<i>Metody izolace DNA řepky</i> .....	7
<i>Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)</i> .....	7
<i>Izolace DNA pomocí SDS</i> .....	9
II.3. Metodika analýzy DNA markerů .....	11
<i>Hybridní systémy CMS Ogu-INRA a Shaan 2A</i> .....	11
<i>Detekce obnovitele fertility (Rfo) u systému Ogu-INRA</i> .....	12
<i>Detekce rostlin se sterilní cytoplazmou u materiálu CMS typu Shaan 2A</i> .....	14
<i>Detekce Rf u CMS typu Shaan 2A</i> .....	17
<i>Detekce Rfo genu v mikrosporových embryích řepky u CMS systému Ogu-INRA</i> .....	20
<i>Detekce autoinkompatibilních haplotypů – detekce a selekce AI rostlin</i> .....	23
<b>III. Srovnání novosti postupů</b> .....	<b>27</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>27</b>
<b>V. Ekonomické aspekty</b> .....	<b>29</b>
<b>V. Seznam použité související literatury</b> .....	<b>31</b>
<b>VI. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>35</b>



## I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je podat přehled o v praktickém šlechtění použitelných postupech pro selekci cílových rostlin – postupech založených na technikách molekulární biologie, na technikách a přístupech molekulárního markerování.

Řepka patří k našim nejdůležitějším plodinám a tomu odpovídá i velký tlak na kvalitu a výkonnost odrůd. Hybridní šlechtění a tvorba F<sub>1</sub> hybridů pak představuje velmi účinný nástroj pro zvýšení výnosového potenciálu, zlepšení celé řady agronomicky významných znaků a samozřejmě je i značnou výzvou pro šlechtitele, vzhledem k řadě problematických otázek, které s hybridním šlechtěním řepky souvisejí. Na IRC 2011 v Praze byla mimo jiné značná pozornost věnována i metodám molekulární biologie, molekulárním markerům a jejich aplikaci pro rozlišování genetických zdrojů o identifikaci samičích (udržovatelé pylové sterility) a samčích (obnovitelé pylové fertility) linií a stanovení stupně hybridity při výrobě hybridního osiva.

Metodika je výsledkem řešení projektu NAZV QI 111A075 „Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky“. Záměrem projektu bylo: zefektivnit šlechtitelské postupy pro tvorbu nových odrůd ozimé řepky s využitím nově vyvinutých, optimalizovaných a ověřených biotechnologických a analytických metod; vytvořit nové výchozí materiály pro šlechtění liniových a hybridních odrůd, vhodných pro potravinářské i technické využití; využít metody molekulární genetiky, explantátových kultur a nové expeditivní metody hodnocení pro výběr a tvorbu perspektivních genotypů; pomocí efektivních šlechtitelských postupů získat materiály pro tvorbu nových liniových a hybridních odrůd ozimé řepky, schopných konkurovat zahraničním odrůdám ve významných hospodářských znacích. Jedním z cílů projektu pak bylo vytvořit rodičovské komponenty a hybridy řepky na bázi systémů CMS s využitím biotechnologických metod a odvodit alelicky specifické markery pro selekci rostlin nesoucích geny obnovy fertility. Metodika navazuje na předchozí metodické výstupy projektu: **Metodika analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (*Brassica napus* L.) a hodnocení jejich diverzity a Metodika detekce a molekulární selekce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.)**, kdy předmětem těchto výstupů bylo využití molekulárních metod při hodnocení genetické diverzity genových zdrojů řepky a pro účely výběru geneticky vzdálených rodičovských komponent pro křížení při tvorbě liniových a hybridních odrůd a dále selekce rostlin nesoucích znaky autoinkompatibility. Předkládaná metodika pak **kompletuje tento soubor a je zaměřena na techniky selekce cílových rostlin z pohledu šlechtění hybridů na bázi CMS Ogu/INRA a Shaan 2A.**





## II. Vlastní popis metodiky

### II.1. Úvod

#### ***Proč techniky molekulární biologie a proč snaha o jejich aplikaci v programech hybridního šlechtění řepky?***

Selekce s využitím markerů neboli MAS (Marker Assisted Selection) resp. modifikace tohoto postupu s větším důrazem na molekulární techniky – MMAS (Molecular Marker Assisted Selection) je již řadu let aktuálním trendem ve šlechtění rostlin. Tento metodický přístup je založen na selekci cílových rostlin/potomstev na základě výsledků analýzy molekulárních markerů. Aplikací těchto postupů lze eliminovat vliv vnějšího prostředí, lze pak účinněji selektovat rostliny i na jiném základě, než-li pouhým fenotypovým výběrem a přístupy MAS/MMAS lze i chápat jako cestu směrem ke genotypové selekci (GS), cílené selekci na základě důkladné znalosti genetické konstituce šlechtitelského ideotypu (Newell, Jannink 2013). Širší aplikace metodických postupů založených na MAS/MMAS může výrazně urychlit šlechtitelský proces a zefektivnit šlechtění (Varshney, Tuberosa 2007).

Genetický marker (signální gen) se používá pro označení jasně se fenotypově projevujícího znaku s jednoduchou dědičností. Označení marker pak předpokládá spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními či kvalitativními znaky (Sozinov 1985). Genetické biochemické markery se musí vyznačovat dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrancí a rovněž vysokou heritabilitou, tj. nezávislostí na podmínkách prostředí (Černý, Šašek 1996). A ačkoli byly předchozí definice genetických markerů vysloveny ještě před érou PCR, OMICS a NextGen technologií, jejich platnost není a nemůže být zpochybnována. Výhodu markerů založených na polymorfismu DNA lze spatřovat v aplikovatelnosti u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA, v jejich nezávislosti na podmínkách prostředí, značném počtu markerovacích technik a markerů, v možnosti použití nedestruktivní analýzy a možnosti jejich využití i pro analýzu rostlin ve velmi raných ontogenetických stádiích (Varshney et al. 2009).

Techniky molekulární biologie – technika molekulárních markerování pak nabízí šlechtiteli mocný nástroj pro jasné a přesné odhalení genetické konstituce analyzovaných rostlin z pohledů cílových znaků, nástroj pro velmi přesnou selekci cílových rostlin/genotypů. Přehled technik/markerů používaných u řepky je uveden v review: Čurn, Sáková, Graman (1995), Čurn, Sáková (1997) a Čurn, Žaludová (2007).

Jednou z oblastí aplikace molekulárních markerů je pak selekce cílových rostlin/genotypů v programech hybridního šlechtění řepky. Hybridní odrůdy řepky ozimé jsou v našich podmínkách dlouhodobě pěstovány a od roku 1998, kdy byl uveden na český trh první komerční hybrid, se podíl hybridních odrůd v osetých

plochách řepky neustále zvyšuje. V roce 2008 došlo k výraznému nárůstu ploch hybridů v porovnání s plochami osetými liniovými odrůdami a podíl hybridních odrůd dosáhl 35 %. V roce 2011 podíl hybridních odrůd přesáhl hranici 50% a v roce 2014 pak dosáhl téměř 80% (Baranyk 2014). Zájem o hybridní odrůdy je dán nejen módní vlnou pěstování  $F_1$  hybridů, ale u řepky došlo v důsledku hybridního šlechtění a zavedení hybridních odrůd k dosažení podstatného pokroku nejen ve výkonnosti, ale také ve stabilitě vysokých výnosů v rozdílných podmínkách a ročnících. Ve srovnání s liniovými odrůdami hybridní odrůdy disponují vyšším výnosovým potenciálem, poskytují stabilnější výnosy v různých pěstitelských podmínkách, jsou odolnější vůči stresu (zimovzdornost a suchovzdornost), lépe reagují na pozdější výsevy, účinněji využívají živiny a i přes vyšší cenu osiva hybridní odrůdy zajišťují stabilní vysokou produkci řepky a zajišťují ziskovost. Heterozní efektu u řepky dosahuje až 10% (Röbbelen 1985; Brandle, McVetty 1989; Kudla 1996; Zehnálek, Holubář 2004; Zehnálek et al. 2005; Zehnálek et al. 2006) a heterozní efekt se projevuje v podobě zvýšení výnosu semene, výnosu oleje, výšky rostlin, vitality a jistoty přezimování (Paulmann 1999; Koprna et al. 2009).

V současnosti jsou v Evropě nejvíce rozšířené hybridní systémy MSL (Mänlicher Sterilität Lembke), CMS (Cytoplasmatic Male Sterility) *Ogu*-INRA a SAFECROSS (Syngenta). Ve světě, zejména v Číně je pak využíván i CMS systém Polima/Shaan. Z mnoha směrů šlechtění výrazně vyčnívá systém Ogura, který umožnil vytvářet restaurované hybridy z různých rodičovských kombinací. Původ tohoto typu cytoplasmatické samčí sterility je v literatuře často chybně udáván a jako zdroj sterility je mylně uváděna japonská odrůda ředkve 'Ogura' (Koprna et al. 2007). CMS byla poprvé v čeledi *Brassicaceae* popsána u japonských odrůd ředkve *Raphanus sativus* H. Ogurou a byla využívána pro účely šlechtění hybridních odrůd (Ogura 1968). "Ogura CMS type" byla záhy introdukována do významných zástupců rodu *Brassica* (*B. oleracea* a *B. napus*) na pracovišti INRA ve Francii a tímto krokem bylo umožněno širší využití CMS systému v hybridním šlechtění řepky (Pelletier et al. 1983, 1987; Budar et al. 2004). První CMS rostliny byly získány na základě mezirodové hybridizace a několikanásobným zpětným křížením (Bannerot et al. 1974) a bohužel kromě stabilního projevu sterility byla u získaných rostlin detekována celá řada nepříznivých vlastností (Bannerot et al. 1977). Tyto znaky byly způsobeny nekompatibilitou mezi jádrem a cytoplazmou a po fúzi protoplastů a získání cybridní kombinace, která nesla chloroplasty *B. napus* a mitochondrie *R. sativus* byly tyto negativní projevy cytoplazmy *R. sativus* eliminovány (Menczel et al. 1987; Pelletier et al. 1987).

První hybridní odrůdy založené na systému *Ogu*-INRA registrované v České republice byly kompozitní, tj. osivo bylo tvořeno ze 70-80 % pylově sterilním hybridním komponentem a z 20-30 % opylovačem – nejčastěji výkonnou odrůdou. Těmito hybridy byly Synergy (1998) a Betty (1999), (Zehnálek, Holubář, 2000). Další etapu hybridního šlechtění představovaly 3-liniové hybridy – Embleme (2002), jehož finální generace štěpí v poměru 1:1 na plně fertlní a sterilní, dále topcross hybrid Spirit (2003), jehož finální generace štěpí na cca 70% pylově fertlních rostlin a 30% pylově sterilních. Aktuálně jsou pěstovány pylově fertlní restaurované hybridy (Zehnálek et al. 2005; Baranyk 2014).

Pro tvorbu restaurovaných hybridů je pak potřebné šlechtit sterilní mateřské komponenty (*S* cytoplazma a *rfo* geny obnovy fertility v jádře), udržovatele sterility (*F* cytoplazma a *rfo* geny obnovy fertility v jádře) a obnovitele fertility (úplný obnovitel s fertilitní/sterilní cytoplazmou a dominantně homozygotní sestavou genů *Rfo* v jádře).

V rámci sdružení Česká řepka je značná pozornost věnována i využití CMS systému *Shaan 2A* a šlechtění  $F_1$  hybridních odrůd využívající tento systém sterility. Zcela originální a jedinečné jsou zejména nové genetické zdroje - sterilní linie a DH linie obnovitelů fertility s požadovanou 00 kvalitou pro systém CMS *Shaan 2A*. Tento systém se ukazuje jako velmi perspektivní pro tvorbu hybridů i v našich podmínkách a je rozpracován v evropských podmínkách k praktickému využití pouze v ČR. Jeho předností je zejména nepřítomnost vazby genu obnovy fertility s vysokým obsahem glukosinolátů či jeho stabilita v široké škále teplotních podmínek, narozdíl od teplotně citlivého příbuzného CMS systému *Polima (pol)*, jehož nestabilita limituje vlastní využití v hybridním šlechtění. Nedostatkem z pohledu selekce cílových rostlin je pak nedostupnost vhodných selekčních markerů.

U řepky je možné pro produkci  $F_1$  hybridů využít i systému autoinkompatibility (AI). U řepky se, obdobně jako u jiných brukvovitých rostlin, přirozeně vyskytuje sporofytický typ AI, kde pylový determinant je produktem buněk tapeta. 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. Autoinkompatibilita je kontrolována jediným úsekem DNA tzv. *S* lokusem, který má velký počet alel (Ockendon 1974; de Nettancourt 1977). *S* haplotypy u rodu *Brassica* jsou podle svého fenotypového účinku na základě klasické genetické analýzy rozděleny do dvou tříd I a II (Nasrallah et al. 1991). *S* haplotypy třídy I jsou dominantní nad třídou II (Nasrallah, Nasrallah 1993). Většina pěstovaných genotypů řepky pak obsahuje v A genomu *S* haplotypy třídy I (homologní s *S* haplotypem *S*<sub>47</sub> *B. rapa*) a v C genomu *S* haplotypy třídy II (homologní s *S* haplotypem *S*<sub>15</sub> *B. oleracea*) (Okamoto et al. 2007; Zhang et al. 2008a). Autokompatibilita u řepky je pak vyvolána mutací v dominantním *S* haplotypu, která vede k supresi funkčního recesivního *S* haplotypu (Okamoto et al. 2007).

Účinným nástrojem pro šlechtění a selekci žádoucích rostlin s funkčním projevem autoinkompatibility (obsahující funkční recesivní *S* haplotyp) je postup založený na využití molekulární analýzy. Seleční markery je možné detekovat v raných fázích ontogeneze a vhodnou kombinací molekulárního a klasického šlechtitelského postupu lze docílit účinné a přesné selekce.

Předkládaná metodika je zacílena na využití molekulárních markerů na bázi analýzy DNA pro účely identifikace a selekce cílových genotypů používaných v hybridním šlechtění CMS systému *Ogu/INRA* a *Shaan 2A*.



## II.2. Metodika izolace DNA

### ***Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA řepky***

- děložní lístky (1-2 týdny po vyklíčení)
- plně vyvinuté pravé listy
- somatická embrya, kotyledonární pletiva

DNA je izolována dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu (odebraného ve skleníkových nebo v polních podmínkách a ihned zpracovávaného, popřípadě uchovávaného do doby izolace na ledu po dobu max 2–4 hod), nebo z materiálu zamraženého (po odebrání je materiál hluboce zmražen a uchováván při teplotě -80°C, krátkodobě je možné uchování i při teplotě -20°C).

### ***Metody izolace DNA řepky***

DNA je izolována z materiálu čerstvého nebo zamraženého. O výtěžnosti, čistotě a možnostech použití takto získané DNA se zmiňujeme v závěru této kapitoly. DNA je možno izolovat mikroextrakčními metodami (komerčně dostupnými kity) nebo pomocí standardních metod izolace DNA.

### ***Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)***

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M 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. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon) odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA.

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1 % merkaptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 µl roztoku. Připravený roztok dáme předehřát na 65°C.
2. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme rostlinné pletivo (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 µl předehřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min lehce promícháme.

4. Po centrifugaci 12000 rpm 10 min se převede supernatant (500  $\mu$ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 500  $\mu$ l chloroformu s IAA, směs se 10 min promíchává a následně centrifuguje 5 min při 12000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5 % CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500  $\mu$ l směsi chloroform–IAA a 10 min protřepáváme. Centrifugujeme 5 min maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250  $\mu$ l) a 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min (až na noc) do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 300  $\mu$ l 1x TE a necháme 30–60 min inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 2 objemy (600  $\mu$ l) ledového (z mrazáku) 96 % ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min, maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
10. Přidáme 1 ml ledového 70 % ethanolu, 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechny supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200  $\mu$ l 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpustit 40 min při 37°C).

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1  $\mu$ l Rnázy A a necháme 30 min inkubovat ve 37°C.

#### Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2 % CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1 % 2-merkapt ethanol, 1 % PVP–40000)
- 2-merkapt ethanol
- 5 % CTAB
- chloroform–IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- isopropanol
- 70 % ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

#### Přístroje:

- chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

### **Izolace DNA pomocí SDS**

Tento postup izolace je vhodný jako rychlá skrínigová metoda, u řepky poskytuje dostatečné množství DNA pro provedení PCR analýz a vychází z postupu publikovaného v práci Edwards et al. (1991).

1. rostlinné pletivo rozdrtíme homogenzátorkem přímo v 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce ve 100  $\mu$ l extrakčního pufru.
2. K homogenátu přidáme 300  $\mu$ l extrakčního pufru a 5 s vortexujeme (tato extrakční směs může být ponechána při laboratorní teplotě i déle než 1 hodinu, dokud nejsou všechny vzorky homogenizovány).
3. Extrakt centrifugujeme 1 min při 13000 rpm a 300  $\mu$ l supernatantu přeneseme do čisté mikrocentrifugační zkumavky.
4. K supernatantu přidáme 300  $\mu$ l isopropanolu vychlazeného na  $-20^{\circ}\text{C}$ , jemně promícháme (3–4x převrátit zkumavku) a směs necháme 2 min srážet. Centrifugujeme 5 min při 13000 rpm.
5. Osušený pelet rozpustíme v 50  $\mu$ l TE pufru. DNA je stabilní ve  $4^{\circ}\text{C}$  déle než 1 rok.

#### Chemikálie:

- SDS extrakční pufr (200 mM Tris–HCl (pH=7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS)
- Isopropanol
- TE pufr (10 mM Tris–HCl, pH=7,5; 0,1 mM EDTA)

#### Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenzátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy, pH metr, lednice





## II.3. Metodika analýzy DNA markerů

### **Hybridní systémy CMS Ogu-INRA a Shaan 2A**

Hybridní systémy *Ogu-INRA* i *Shaan 2A* jsou typem cytoplazmaticko-genové sterility, při které je výsledný genotyp mateřské pylově sterilní linie závislý nejen na "sterilní cytoplazmě" - plazmotypu „S“, ale také na přítomnosti genů obnovy fertility *Rf* (resp. *Rfo*) v jádře. Genetická konstituce mateřských pylově sterilních CMS linií je (S)*rfrf*, kde S značí sterilní cytoplazmu a *rf* jaderný gen pro obnovu fertility v homozygotně recesivní konstituci. Sterilita ("sterilní cytoplazma") je determinována mitochondriálními geny. Gen obnovy fertility *Rf* má dominantní charakter a interakce dominantního genu obnovy fertility v jádře a sterilní cytoplazmy vede k obnově fertility. Pylově fertillní udržovatelé sterility mají založení (F)*rfrf*, kde F značí normální (fertillní) cytoplazmu. Úplný obnovitel fertility může mít cytoplazmu plazmotypu „S“ nebo „F“, ale musí být dominantně homozygotní a v jádře nese genotyp *RfRf*. Pokud dojde k opylení sterilní linie heterozygotním obnovitelem fertility *Rfrf*, výsledkem je generace F<sub>1</sub>, kde vyštěpuje 50 % fertillních a 50 % sterilních rostlin.

Komponenta	Cytoplazma	Jádro	Fenotyp (produkce pylu)
CMS sterilní linie	S	<i>rfrf</i>	Sterilní
Udržovatel sterility	F	<i>rfrf</i>	Fertillní
Neúplný obnovitel fertility	S/F	<i>Rfrf</i>	Fertillní
Úplný obnovitel fertility	S/F	<i>RfRf</i>	Fertillní

Otcovské linie - obnovitelé fertility se vytvářejí z původních výchozích materiálů opakovaným zpětným křížením s perspektivními liniemi typu (F)*rfrf*, kterými jsou prakticky veškeré pylově fertillní odrůdy, šlechtitelské materiály a dihaploidní (DH) linie ozimé řepky. Pro urychlení a zefektivnění tvorby *Rf* linií se využívá metoda produkce dihaploidních (DH) linií technikou mikrosporových kultur (Vyvadilová a kol. 2008). Tato metoda umožňuje získat dominantní homozygoty pro *Rf* gen z kříženců s donory požadovaných znaků prakticky během jedné generace. Nevýhodou tohoto postupu je nicméně fakt, že selekce cílových rostlin – homozygotních obnovitelů fertility je prováděna až v době květu (selekce rostlin fenotypově vykazujících pylovou fertillitu u genotypů nesoucích sterilní cytoplazmu) a ověření schopnosti obnovovat fertillitu je provedeno až na základě experimentálního křížení a hodnocení nasazení semen u F<sub>1</sub> hybridů.

Molekulární přístup umožňuje selekci rostlin nesoucích *Rf* gen (respektive dominantní alelu tohoto genu) v raných ontogenetických stádiích a pokud je vhodně kombinován s flow-cytometrickou analýzou lze takto rychle a spolehlivě selektovat diploidní dominantně homozygotní rostliny (DH regeneranty).

## **Detekce obnovitele fertility (*Rfo*) u systému *Ogu-INRA***

Detekce je založena na PCR detekci přítomnosti dominantní alely genu *Rfo* u analyzovaných rostlin.

Pro PCR analýzu byly pro účely předkládané metodiky použity primery navržené v úseku genu PPR; PPR-B (GenBank AJ550021) RsPPRB-F a RsPPRB-R, které generovaly u rostlin nesoucích gen k obnově fertility amplikon o velikosti ~ 1,5kb. PCR reakci je možné doplnit o kontrolní primery amplifikující nekódující úsek o velikosti ~ 200bp ve všech vzorcích. Dále lze použít primery SG34U a SG34L (Primard-Brissed 2005), detekující rostliny nesoucí gen k obnově fertility přítomností amplikonu o velikosti ~ 1kb.

Sekvence primerů používaných pro PCR analýzu.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence '5—3'</b>	<b>Annealing</b>
RsPPRB-F	GAAGCTCTTGCTACCCATCG	59°C
RsPPRB-R	TGACATGCTTCGATCTCGTC	59°C
SG34U	TATATTGTACCTTTGCCTCTTC	55°C
SG34L	CTTTTCTTTTAGTTTTTGGTTT	55°C

PCR reakce pak probíhá v objemu 20 µl, v 1x reakčním pufru PPP (Top Bio), 1x BSA, 0,5 µM každého primeru (IDT) a 5-10 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 10 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 1 µl každého primeru (10 µM); či 0,5 µl v případě duplexové PCR
- 2 µl 10xBSA
- 5 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu pro primery RsPPRB-F/R:

- počáteční denaturace 5 min 95°C
- 35 cyklů: 30 s 95°C  
45 s 59°C  
2 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

Teplotní profil pro primery SG34U a SG34L zahrnoval:

- počáteční denaturace 2,5 min 94°C
- 30 cyklů: 30 s 94°C  
1 min 55°C  
2 min 72°C
- konečná elongace 5 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 30 V 20min, 90 V 1hod a 30min. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem.

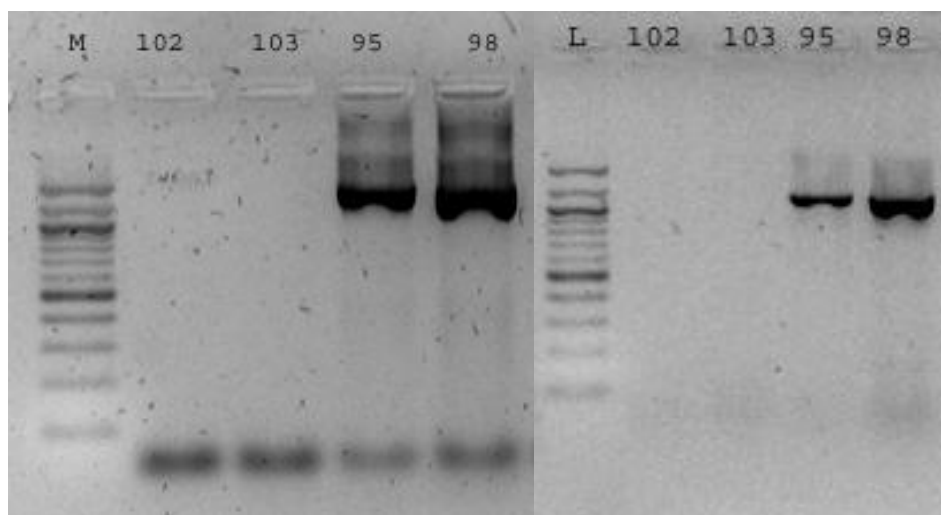
Chemikálie:

- PPP Master Mix (2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva)
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocykler
- centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

Detekce genu *Rf* u rostlin řepky pomocí primeru RsPPRB-F/R (vlevo) a G34U a SG34L (vpravo).



- 102 – A115 výchozí CMS
- 103 – B115 udržovatel sterility
- 95 – 4069/2 obnovitel fertility
- 98 – 4108/3 obnovitel fertility

## **Detekce rostlin se sterilní cytoplazmou u materiálu CMS typu Shaan 2A**

Detekce je založena na PCR detekci přítomnosti příslušné sekvence u analyzovaných rostlin a na PCR-RFLP detekci rozdílných fragmentů u primerového páru S2A178F/R.

Pro PCR analýzu byly pro účely předkládané metodiky použity primerové páry S2A178F/S2A178R a S2A1.3F/S2A1.3R.

Sekvence primerů používaných pro PCR analýzu.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence '5—3'</b>	<b>Annealing</b>
S2A178F	TGGAGTACTTGGGATCAGCA	60
S2A178R	ATCTCGCAGACGATCAAGGT	60
S2A1.3F	AGTGGACCGGGTAGTGCTTA	57
S2A1.3R	CCTCCAGACAGCTTCACTCC	57

PCR reakce pak probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru (PPP MM; Top-Bio), 12,5 pM primeru (IDT) a 10 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 1,25 µl každého primeru (10 µM)
- 9 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min 94°C
- 35 cyklů: 30 s 94°C  
30 60/57°C  
1,5 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 30 V 20min, 90 V 1hod a 30min. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem.

#### Chemikálie:

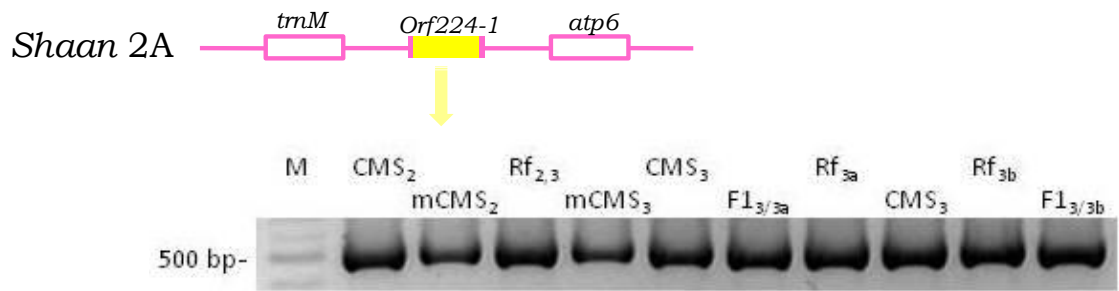
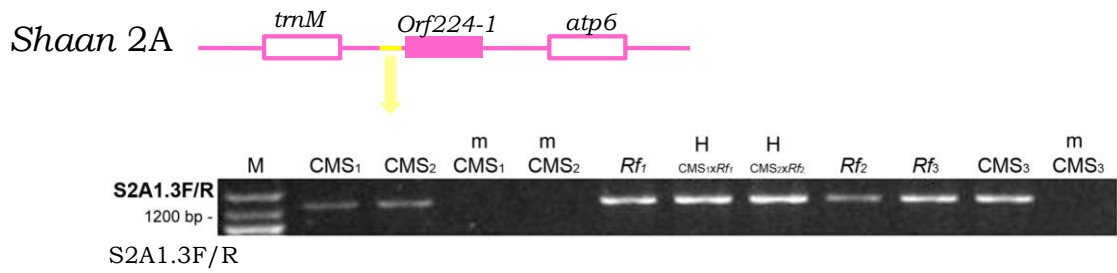
- PPP Master Mix (2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva)
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

#### Přístroje:

- PCR thermocykler
- centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

S použitím primerů S2A1.3F a S2A1.3R (amplifikujících nekódující úsek mtDNA, lokalizovaný v horní části řetězce před vlastním *orf224-1*), byla amplifikační fragmentů o velikosti přibližně 1300bp detekována CMS mitochondriální sekvence přítomná v CMS rostlinách, obnovitelných fertility (odvozených z CMS) a u odvozených F<sub>1</sub> hybridů. U udržovatelů sterility nedocházelo k amplifikaci této sekvence, jelikož mají jako jediní fertilní cytoplazmu.

Specifické primery S2A178F a S2A178R amplifikující část mitochondriálního genu *orf224-1* (zodpovědného za CMS) vedly k detekci velikostně podobné sekvence i u udržovatelů sterility. Na základě výrazných odlišností v nefunkční sekvenci udržovatelů je však možné její nositele identifikovat použitím restričních enzymů – v našem případě byla použita restriční endonukleáza *MseI*.



**S2A178F/R**

```

CMS      TGGAGTACTGGGATCAGCAGAAATCTAAAACTATGGAACCAACTGCTTTCACACCGGGG 60
Rf       TGGAGTACTGGGATCAGCAGAAATCTAAAACTATGGAACCAACTGCTTTCACACCGGGG 60
mCMS     .....

CMS      GAAGACCCCTCTGAGCAGAGGAGGCTTGG---AAAAATGATAGTTCAGATTCAAGTGG 117
Rf       GAAGACCCCTCTGAGCAGAGGAGGCTTGG---AAAAATGATAGTTCAGATTCAAGTGG 117
mCMS     .....

CMS      GTTCAGAGTATCAGCGTTGGCCGCCCATTTATTTATCATTTTCTGGTCCCAAATGGGG 177
Rf       GTTCAGAGTATCAGCGTTGGCCGCCCATTTATTTATCATTTTCTGGTCCCAAATGGGG 177
mCMS     .....

CMS      ACCAGTTTCTACATTATATAATAATTTT---TTTTGTTGTTGGGGTGAATGGGGGGTA 236
Rf       ACCAGTTTCTACATTATATAATAATTTT---TTTTGTTGTTGGGGTGAATGGGGGGTA 236
mCMS     .....

CMS      TTAGAAATGAAATTTGTCAATTTGGGCTGGGACCAAGATGGGCTGGCCCGCCCGAGCGGTG 296
Rf       TTAGAAATGAAATTTGTCAATTTGGGCTGGGACCAAGATGGGCTGGCCCGCCCGAGCGGTG 296
mCMS     .....

CMS      GATCTCAAGACGCGCCCGCTCTGATCTTTTGTACGCGGATGTTGAGAGTTCGAGCTCT 366
Rf       GATCTCAAGACGCGCCCGCTCTGATCTTTTGTACGCGGATGTTGAGAGTTCGAGCTCT 366
mCMS     .....

CMS      CAACAGCCGCAATATGACATGTAGCCGCACTTTAGCCGCTACAGAGATCACCCAA 416
Rf       CAACAGCCGCAATATGACATGTAGCCGCACTTTAGCCGCTACAGAGATCACCCAA 416
mCMS     .....

CMS      AAATAGAGGGTGAAGCGGATATCGTGGGCGTCAAGCCCTCTCGATATAATGAAATGG 476
Rf       AAATAGAGGGTGAAGCGGATATCGTGGGCGTCAAGCCCTCTCGATATAATGAAATGG 476
mCMS     .....

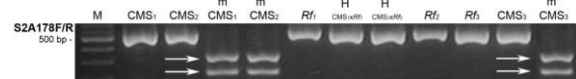
CMS      GAGGTCAGAA---SCCTTCAGGAGCAGCTTTGGGATCTTTTGGACCTTGAATGCTCTGG 531
Rf       GAGGTCAGAA---SCCTTCAGGAGCAGCTTTGGGATCTTTTGGACCTTGAATGCTCTGG 531
mCMS     .....

CMS      AGAT 536
Rf      AGAT 536
mCMS     ....
    
```

Sekvenační analýza

MseI

PCR-RFLP



CMS - CMS linie Shaan 2A  
mCMS - udržovatel sterility

Rf - obnovitel fertility  
F<sub>1</sub> - F<sub>1</sub> hybrid

## Detekce Rf u CMS typu Shaan 2A

Detekce je založena na PCR detekci přítomnosti fragmentů.

Pro PCR analýzu byly pro účely předkládané metodiky použity primerové páry 3F a 4R, 14o1 a 14o4 (Formanová et al. 2010) a SSR primery KBrDP1F/R (Li et al. 2011), amplifikující oblast DNA, která je ve vazbě s genem pro obnovu fertility u CMS systému Polima a dále nově vyvinuté primery Rf84F/R.

Sekvence primerů používaných pro PCR analýzu.

Primer	Sekvence '5—3'	Annealing
3F	GTTCTTACAGTGGCGTAAAGATGAG	57°C
4R	AAGCTTCCACAGGTCCAGAGTAC	57°C
Rf84F	TGCCATTGTAAGAACTAAGAAGAGG	57°C
Rf84R	GCTTCTTAGTTCAACGATGGC	57°C
14o1	CTTCTTCGACAGAGAAACGTG	57°C
14o4	CAGAAGCTGATTCCTGATGATG	57°C
KBrDP1F	CACTCTTTTAGGAGAAGCACGAA	55°C
KBrDP1R	CCCGCATAGTTTGTCAGTTTCT	55°C

PCR reakce pak probíhá v objemu 20 µl, v 1x reakčním pufru (PPP MM; Top-Bio), s optimální koncentrací primeru (IDT) a ~25-70 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 10 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA (~25-70 ng)
- x µl každého primeru (0,5µM pro 3F/R, Rf84F/R a 14o4; 0,3 µM pro KBrDP1)
- x µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu pro 3F/4R, Rf84F/R a 14o1/4:

- počáteční denaturace 5 min 94°C  
30 s 57°C  
1,5 min 72°C
- 35 cyklů: 30 s 94°C  
30 s 57°C  
1,5 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

Pro primery KBrDP1:

- |                        |        |                    |
|------------------------|--------|--------------------|
| • počáteční denaturace | 5 min  | 94°C               |
| • 10 cyklů             | 40 s   | 94°C               |
|                        | 45 s   | 60°C -0,5°C cyklus |
|                        | 45 s   | 72°C               |
| • 30 cyklů:            | 40 s   | 94°C               |
|                        | 45 s   | 55°C               |
|                        | 45 s   | 72°C               |
| • konečná elongace     | 10 min | 72°C               |
| • stop                 | –      | 4°C                |

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 30 V 30min, 90 V 1hod a 30min. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem.

Chemikálie:

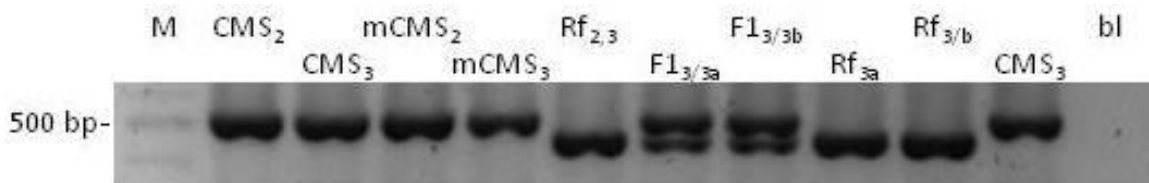
- PPP Master Mix (2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva)
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocykler
- centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

Primerový pár 3F a 4R detekoval CMS rostliny společně s udržovateli sterility přítomností amplikonů o velikosti přibližně 500 bp a obnovitele fertility přítomností amplikonů přibližně 440 bp. V F<sub>1</sub> generaci byly detekovány oba fragmenty. Sekvenační analýza těchto fragmentů prokázala delecí úseku o velikosti 62bp (oblast začínající od 140 nukleotidu forward primeru) u všech nositelů genu pro obnovu fertility. Na základě této analýzy byly navrženy nové primery Rf84F/R, amplifikující 164bp úsek u sterilních rostlin, udržovatelů a F<sub>1</sub> rostlin, zatímco 84bp fragment byl přítomen pouze u homozygotních nositelů Rf genu.





SCAR marker - primery 4R/3F (Formanová et al. 2010)

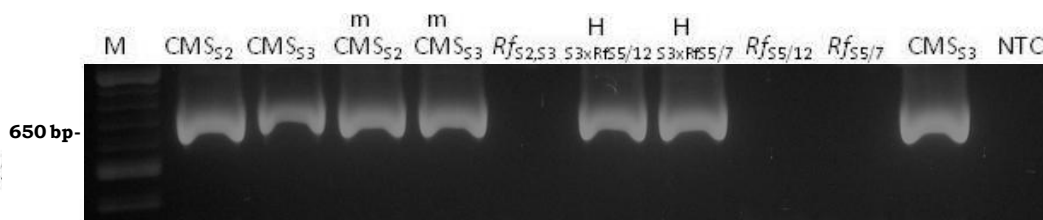
Na základě získané sekvence byl vyvinut nový molekulární marker k detekci *Rf*



primery Rf84F/R

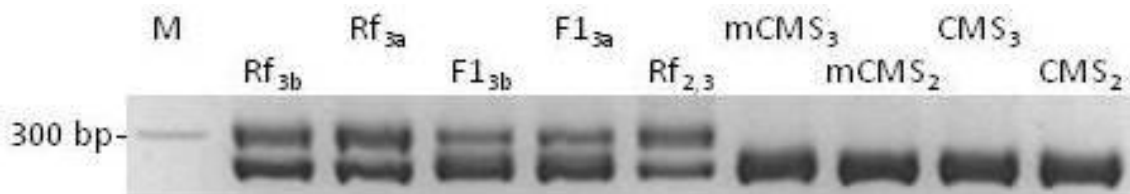
Primerový pár 14o1 a 14o4 amplifikoval fragment o velikosti přibližně 700 bp u všech rostlin s výjimkou obnovitelů fertility.

### •Detekce *Rf*



SCAR marker - primery 14oF/R (Formanová et al. 2010)

Mikrosatelitový primerový pár KBrDP1 detekuje CMS rostliny a udržovatele sterility přítomností fragmentu o velikosti ~280 bp, zatímco u obnovitelů fertility a F<sub>1</sub> hybridů se amplifikuje druhý fragment o velikosti ~300 bp.



Primer KBrDP1 (Li et al., 2011)

Rf – udržovatel sterility pro S2 (DH)  
F1 – F<sub>1</sub> hybrid

CMS linie Shaan 2A  
mCMS – udržovatel sterility

## **Detekce *Rfo* genu v mikrosporových embryích řepky u CMS systému *Ogu-INRA***

Embrya byla získána z pylových zrn  $F_1$  rostlin jedné kombinace křížení, byla rozdělena do třech velikostních frakcí  $A \geq 3,5$  mm;  $B \geq 2,75-3,49$  mm a  $C \geq 2-2,74$  mm. Detekce nositelů genu pro obnovu fertility byla provedena nedestruktivní metodou; odebráním kotyledonárního pletiva a následnou PCR detekcí se specifickými primery pro úsek genu PPR-B.

Technika mikrosporových kultur a diploidizace pomocí trifluralinu v mikrosporové suspenzi byla provedena dle dříve publikovaného protokolu (Klíma et al. 2008). Za účelem genotypizace byly z každého embrya nedestruktivně (bez poškození apikálního meristému) v aseptických podmínkách odebrána kotyledonární pletiva k extrakci DNA. Embryo bylo přeneseno do regeneračního media (RM; Klíma et al. 2004). Nedostatečně veliká embrya nevhodná k nedestruktivnímu kotyledonárnímu odběru byla nejprve kultivována na DM médiu po dobu 2-3 týdnů. Následná kultivace embryí byla provedena dle protokolu Klíma et al. (2008) za účelem dosažení kořenících regenerantů schopných přenosu do půdy a získání osiva dihaploidních rostlin.

DNA byla izolována dle protokolu Edwards et al. (1991) a detekce genu *Rfo* byla provedena pomocí specifických primerů RsPPRB-F/RsPPRB-R. Druhý použitý primerový pár byl použit jako pozitivní kontrola sloužící k amplifikaci vždy přítomného úseku *B. napus* odvozeného z AFLP markeru.

Sekvence primerů používaných pro PCR analýzu.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence '5—3'</b>	<b>Annealing</b>
RsPPRB-F	GAAGCTCTTGCTACCCATCG	59°C
RsPPRB-R	TGACATGCTTCGATCTCGTC	59°C
208F	TCGGGATGGAAACCATACTC	59°C
208R	GGTCCCAGATAAGGGGAAAA	59°C

Duplex PCR byla provedena v objemu 20  $\mu$ l, tvořeného 1x reakčním pufrem PPP (Top Bio), 1x BSA, 0,25  $\mu$ M každého primeru (IDT) a 5-10 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 10  $\mu$ l PPP master mixu
- 1  $\mu$ l DNA
- 0,5  $\mu$ l každého primeru (10  $\mu$ M)
- 2  $\mu$ l 10xBSA
- 5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 20  $\mu$ l)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 5 min 95°C
- 35 cyklů: 30 s 95°C  
45 s 59°C  
2 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

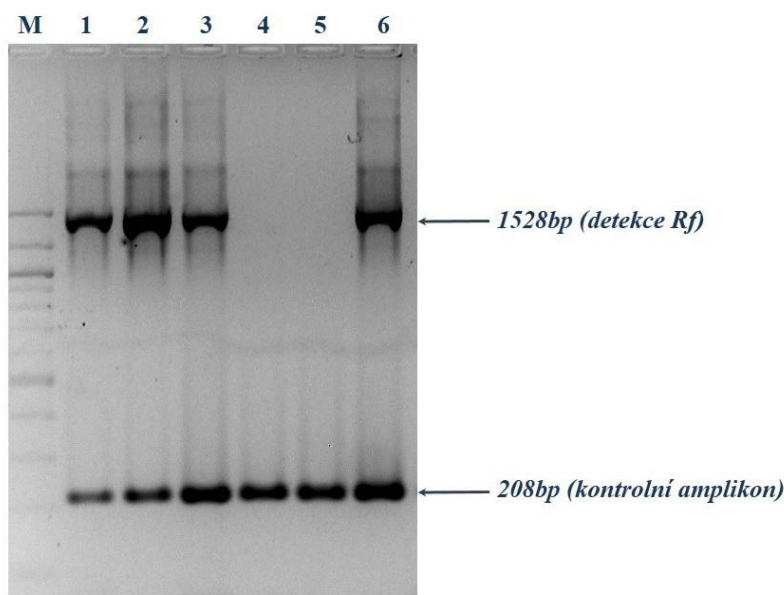
PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 30 V 30min, 90 V 1hod a 30min. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem.

Chemikálie:

- PPP Master Mix (2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva)
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocycler
- centrifuga, sada automatických pipet, mrazák



1-3 a 6  
4-5

embrya nesoucí gen pro obnovu fertility  
embrya bez genu pro obnovu fertility



## **Detekce autoinkompatibilních haplotypů – detekce a selekce AI rostlin**

DNA byla izolována dle CTAB-PVP a detekce AI haplotypů byla provedena pomocí specifických primerů SLGa (Zhang et al. 2008b), které amplifikují cca 1 kb dlouhý fragment u AK rostlin. U AI rostlin, které mají funkční S haplotyp tento fragment není amplifikován. Jako vnitřní kontrola byl použit primerový pár SCO3 (Zeng et al. 2009), který amplifikuje fragment o délce 750 bp u všech rostlin (pozitivní kontrola správného průběhu PCR reakce).

Sekvence primerů používaných pro PCR analýzu.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence '5—3'</b>	<b>Annealing</b>
SLGa_F	GATTCTACTTCCTCCTGCCT	58°C
SLGa_R	ATTACAGTCGCTAAGGCACC	58°C
SCO3_F	TGATGCAGGAACCTTGAAGC	58°C
SCO3_R	GAGCATCTTGCATGGAGGTC	58°C

Duplex PCR byla provedena v objemu 20 µl, tvořeného 1x reakčním pufrům PPP (Top Bio), 1x BSA, 0,25 µM každého primeru (IDT) a 10 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 10 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl každého primeru (10 µM)
- 2 µl 10xBSA
- 5 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 3 min 95°C
- 35 cyklů:
  - 30 s 94°C
  - 45 s 58°C
  - 1 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Podmínky separace: 30 V 30min, 90 V 1hod a 30min. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem.

Chemikálie:

- PPP Master Mix (2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva)
- templátová DNA
- primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

Přístroje:

- PCR thermocykler
- centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

Schéma křížení donorů AI a donorů kvality (funkčních a nefunkčních S haplotypů) a vyštěpování haplotypů v populaci dihaploidních rostlin.

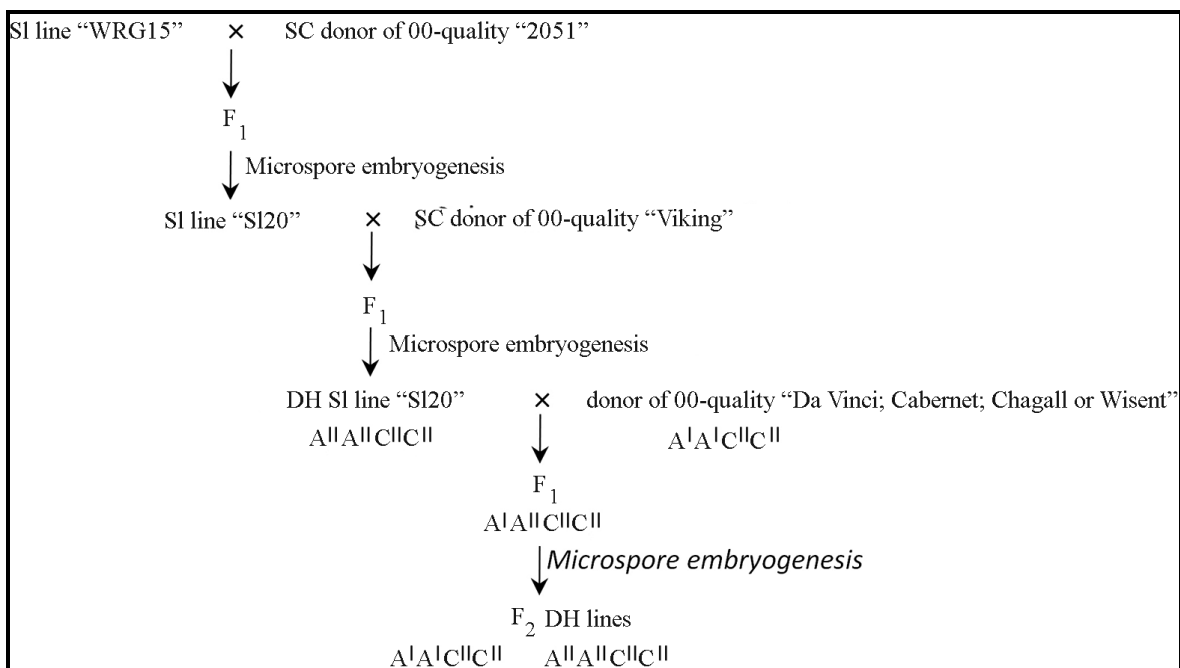
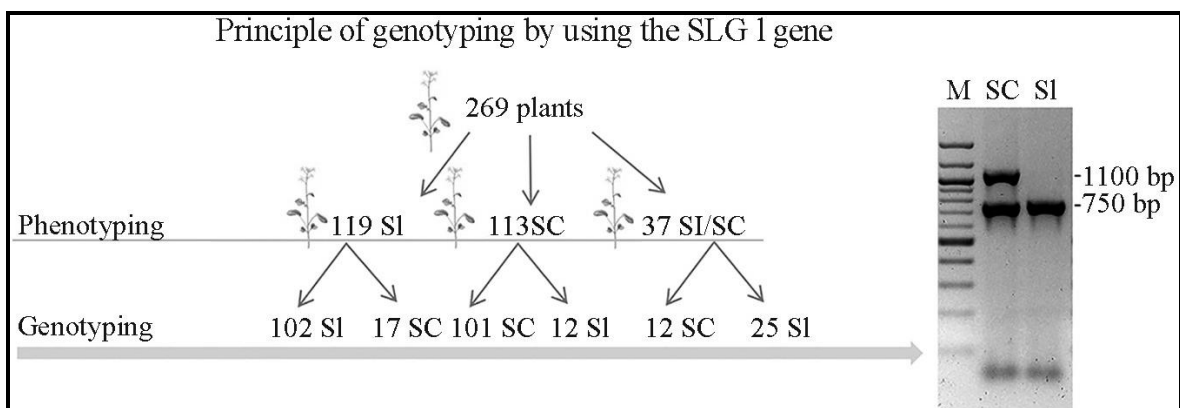


Schéma selekce AI rostlin s funkčním S haplotypem.



Duplex PCR s primery specifickými pro SLG-I, amplifikace ~1.1 kb fragmentu u AK rostlin, u AI rostlin nedochází k amplifikaci tohoto fragmentu. U všech rostlin pak dochází k amplifikaci 750 bp kontrolního fragmentu. Oba obrázky převzaty z Havlíčková et al. (2014).





### III. Srovnání novosti postupů

Předkládaná „Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.)“ je aktuální a nová, protože v současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se touto problematikou. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou molekulárních markerů, komplexní zpracování selekčních markerů pak dostupné není. Molekulární markery představují ve srovnání s morfologickými či biochemickými markery kvalitativně nový přístup, který má na jedné straně obrovský potenciál využití, avšak na straně druhé i své limity. Reálná interpretace molekulárních dat obvykle vyžaduje kvalifikovanou volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Využití analýzy molekulárních markerů pro popis a charakterizaci genotypů je předmětem předkládané metodiky.

### IV. Popis uplatnění metodiky

„Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.)“ v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části pak jsou uvedeny postupy izolace DNA a protokoly pro PCR detekci jednotlivých genů, resp. cílových genotypů.

Metodika představuje soubor optimalizovaných návodů molekulární analýzy, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů u řepky s cílem selekce požadovaných genotypů. Výstupem analýzy je pak PCR produkt odpovídající detekované sekvenci. Molekulární markery nejsou dosud standardně pro účely selekce požadovaných genotypů používány, mohou být ale vhodným doplňkem klasických šlechtitelských selekčních postupů a oproti nim skýtají značné výhody.

Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a šlechtitelská, která mohou s výhodou využít předností analýzy molekulárních markerů – rychlost analýzy, vysoká míra polymorfismu a nízké ovlivnění faktory vnitřního a vnějšího prostředí. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy OSEVA PRO s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.



## V. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické přínosy metodiky jsou kalkulovány až do výše 3.200 tis. Kč. Dalšími přínosy předkládané metodiky jsou rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v biotechnologické laboratoři, rozšíření portfolia technik a služeb prováděných v laboratoři, metodická a vzdělávací funkce.

Přínosem pro šlechtění rostlin je úspora nákladů v procesu šlechtění – zkrácení šlechtitelského procesu o 1 rok lze při celkových nákladech na jednu odrůdu a délce šlechtění (7-10 let) uspořit 800 tis. Kč, při vzniku nové odrůdy (s využitím molekulární selekce) by finanční přínos pro uživatele (šlechtitele) plynul z licenčního poplatku (nová odrůda by mohla být zasetá na 2500 ha po dobu 4 let s výnosem 2,8 t/ha, licenční poplatek je 60 Kč z 1 kg prodaného osiva, na 1 ha jsou zapotřebí asi 4 kg, takže  $2500 \cdot 60 \cdot 4 = 600$  tis Kč/rok x 4 roky = celkem finanční přínos je 2,4 mil. Kč.

Do nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice lze započítat pořízení nejnужnějšího investičního a neinvestičního vybavení pro provoz laboratoře a provedení úkonů a postupů uváděných v metodice v celkové minimální výši 1,100 tis. Kč. V případě automatizace izolace DNA a zpracování velkého objemu vzorků je pak nutné počítat s dalšími náklady na pořízení linky pro izolaci DNA pomocí paramagnetických partikulí v objemu cca 2,5 mil Kč a automatické čipové elektroforézy nebo fragmentačního analyzátoru ve výši 1,4 mil Kč. Další náklady pak představují náklady na chemikálie a na základě dlouhodobých kalkulací činí jednotková cena za analýzu jednoho vzorku 270 Kč (ceny za chemikálie). V uvedeném příkladu kalkulace nákladů nejsou uvedeny doplňkové náklady, odpisy, náklady na vzdělávání a vyškolení personálu laboratoře, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace a vybavenosti (materiální i personální) pracoviště.

Jako ekonomicky výhodnější se jeví analýza markerů ve specializovaných laboratořích, kde lze sdílet náklady na pořízení investic, výchovu a vzdělávání pracovníků, služby.



## V. Seznam použité související literatury

- Bannerot H., Boulidard L., Cauderon Y., Tempe J. (1974). Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. Proc. Eucarpia Meeting Cruciferae, Dundee, 52-54.
- Bannerot H., Boulidard L., Chupeau Y. (1977): Unexpected difficulties met with the radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. Eucarpia Cruciferae Newsletter, 2: 16.
- Baranyk P. (2014): Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2014/15. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, SPZO s.r.o. Praha.
- Brandle J.E., McVetty P.B.E. (1989): Heterosis and combining ability in hybrids derived from oilseed rape cultivars and inbred lines. Crop Science, 29: 1191–1195.
- Budar F., Delourme R., Pelletier G. (2004): Male Sterility. In: Pua E.C., Douglas C.J. (eds.): Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 54. Brassica. Springer-Verlag, pp. 43-64.
- Černý J., Šašek A. (1996): Bílkovinné signální geny pšenice obecné. ÚZPI, Praha.
- Čurn V., Žaludová (2007). Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. In: Gupta S. (ed.): Rapeseed Breeding. (Advances in Botanical Research, Volume 45). Elsevier Publ., pp. 155-179.
- Čurn V., Sáková L. (1997). Využití biochemických markerů ve šlechtění řepky a dalších brukvovitých plodin. Genetika a šlechtění, 33: 281-305.
- Čurn V., Sáková L., Graman J. (1995): Elektroforéza isoenzymů a neenzymatických bílkovin - metody a aplikace v genetice a šlechtění rostlin. Genetika a šlechtění, 31: 207 - 228.
- De Nettancourt D. (1977): Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Edwards K., Jihstone C., Thompson C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res., 19: 1349.
- Formanová N., Stollar R., Gedde R., Mehé L., Laforest M., Landry B.S., and Brown G.G. (2010). High-resolution mapping of the *Brassica napus* Rfp restorer locus using Arabidopsis-derived molecular markers. Theor. Appl. Genet., 120: 843-851.
- 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.
- Klíma M., Vyvadilová M., Kučera V. (2008): Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. Czech J. Genet. Plant Breed., 42: 30–36.
- Koprna R., Macháčková I., Horáček J., Ehrenbergerová J. (2007): Utilization of Ogu-INRA hybrid system in winter rapeseed breeding. MendelNet'07 Agro. <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/index.php?page=bioros>.
- Koprna R., Kučera V., Macháčková I., Horáček J., Ehrenbergerová J. (2009): Development of fertility restorers of winter oilseed rape with low glucosinolate content for the CMS Ogu-INRA system. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 45: 123-127

- Kudla M. (1996): General combining ability of inbred lines and heterosis effect of winter oilseed rape F1 and F2 hybrids. In: *Rośliny Oleiste*, 1996, 17: 61-71.
- Li Y., Liu Z., Cai Q., Yang G., He Q., and Lu P. (2011): Identification of a microsatellite marker linked to the fertility-restoring gene for a polima cytoplasmic male-sterile line in *Brassica napus* L. *African Journal of biotechnology*, 10: 9563-9569.
- Menczel L., Morgan A., Brown S., Maliga P. (1987): Fusion-mediated combination of Ogura-type cytoplasmic male sterility with *Brassica napus* plastids using X-irradiated CMS protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 6: 98-101.
- Murray H.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8: 4321-4325.
- 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 and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 393-422.
- Newell M., Jannink J. (2013): Genomic selection in plant breeding. In: Fleury D., Whitford R. (eds.): *Crop Breeding: Methods and Protocols*. Humana Press, Springer New York, Heidelberg, Dordrecht, London. pp. 117-130.
- Ockendon D.J. (1974): Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open-pollinated cultivars of Brussel sprouts. *Heredity*, 33: 159-171.
- Ogura H. (1968): Studies on a new male-sterility in Japanese radish with special reference to utilisation of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem. Fac. Agri Kagoshima Univ.*, 6: 39-78.
- 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.
- Paulmann W. (1999): Pokrok ve šlechtění hybridní řepky a pěstování MSL – hybridních odrůd. Sborník, Seminář Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejin 16.-18..11.1999, Hluk, pp. 96-99.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chétrit P., Remy R., Rouselle P., Renard M. (1983): Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Molecular Genetics*, 191: 244–250.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chétrit P., Renard M., Delourme R. (1987): Molecular, phenotypic and genetic characterization of mitochondrial recombinants in rapeseed. *Proceedings from 7th International Rapeseed Congress, Vol.I., Poznań, 1987*, pp.113-118.
- Primard-Brisset C., Poupard J.P., Horvais R., Eber F., Pelletier G., Renard M., Delourme R. (2005): A new recombined double low restorer line for the Ogu-INRA cms in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 111: 736-746.
- Röbbelen G. (1985): Züchtung von Hybridraps. *Bericht der Arbeitstagung Saatzuchtleiter, Gumpenstein*, pp. 173-185.
- Sozinov A.A. (1985): Protein polymorphism and its importance in genetics, breeding and evolution. - In: Sozinov A.A. (ed.): *Molekulyarnye Mekhanizmy Geneticheskikh Protsesov. Molekulyarnaya Genetika, Evolyutsiya i Molekulyarno-Geneticheskie Osnovy Selekcii*. Nauka, Moscow, pp. 219 - 238.

- Varshney R.K., Hoisington D.A., Nayak S.N., Graner A. (2009): Molecular plant breeding: methodology and achievements. *Methods Mol. Biol.*, 513: 283-304.
- Varshney R.K., Tuberosa R. (Eds.) (2007): *Genomics-Assisted Crop Improvement*. Vol 1 and 2. Springer, Dordrecht.
- Vyvadilová M., Klíma M., Kučera V. (2008): Metodika produkce dihaploidních linií pro šlechtění řepky ozimé. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Zehnálek P., Holubář J. (2000): Přehled odrůd olejnin a kmínu 2000. ÚKZÚZ Brno, ISBN 80-86051-66-8.
- Zehnálek P., Holubář J. (2004): Přehled odrůd olejnin a kmínu 2004. ÚKZÚZ Brno, ISBN 80-86548-42-2.
- Zehnálek P., Holubář J., Mezlík T. (2005): Přehled odrůd olejnin a kmínu 2005. ÚKZÚZ Brno, ISBN 80-86548-63-5.
- Zehnálek P., Holubář J., Mezlík T. (2005): Přehled odrůd olejnin a kmínu 2005. ÚKZÚZ Brno, ISBN 80-86548-63-5.
- Zehnálek P., Holubář J., Mezlík T. (2006): Seznam doporučených odrůd 2006: Řepka olejka. ÚKZÚZ Brno, ISBN 80-86548-75-9.
- Zeng F., Yi B., Tu J., 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., Fu T., Li Y., Wang T., Chen O., Tu J., Shen J. (2008b): Development of SCAR markers linked to selfincompatibility in *Brassica napus* L. *Mol. Breed.*, 21: 305-315.
- Zhang X., Ma C., Tang J., Tang W., Tu J., Shen J., 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.





## VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

**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.

**Žaludová J., Havlíčková L., Jozová E., Kučera V., Vyvadilová M., Klíma M., Čurn V. (2013):** Marker assisted selection as a tool for detection of *Brassica napus* plants carrying self-incompatibility alleles, in hybrid breeding programs. *Romanian Agricultural Research*, 30: 1-10.

**Havlíčková L., Čurn V., Jozová E., Kučera V., Vyvadilová M., Klíma M. (2012):** Sequence analysis of the mtDNA region correlated with Shaan 2A cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Czech J. Genet. Plant Breed.* 48: 139-142.

**Čurn V., Nováková A., Šimáčková K., Ondřichová B., Bárta J. (2008):** Molecular markers as a tool for plant breeding and variety identification. Prohnes J., Badenes M.L.(eds): *Modern variety breeding for present and future needs*. 18th Eucarpia General Congress, Valencia, 2008, p. 699-703.

**Kukolíkova B., Curn V., Koprna R., Novakova A., Simackova K. (2008):** The comparison of polymorphism and expressin of SLG gene in the varieties and SI/SC lines of oilseed rape. XX Int. Congress Genetics, Berlin, July 12-17, 2008, p. 76.

**Čurn V., Žaludová (2007):** Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. In: Gupta S. (ed.): *Rapeseed Breeding*. (Advances in Botanical Research, Volume 45). Elsevier Publ., pp. 155-179.

**Kukolíkova B., Zaludova J., Curn V., Koprna R. (2007):** Efficiency of marker assisted selection of self-incompatible oilseed rape varieties. - 6th Plant Genomics European Meetings, Tenerife, 3-6 October 2007, p. 801.

**Žaludová J., Kukolíková B., Čurn V. (2007):** Marker-assisted selection of self-incompatible oilseed rape plants. Proc. 12th Int. Rapeseed Congress, Wuhan, China, Science Press USA, pp.333-335.

**Žaludová J., Kukolíková B., Čurn V. (2006):** Distribution of S-alleles in *Brassica napus*. - Proc. 28<sup>th</sup> Sci. Conf. Oilseed Crops, Poznan, 12-13.06.2006, p. 35-36.

**Čurn V. (2005):** Molekulární markery - protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.

**Hájková P., Hrubý J., Pernová E., Čurn V., Žaludová J. (2005):** Monitorig pěstebních ploch, přenos a detekce transgenů geneticky modifikované řepky olejky (*Rassica napus* L. var. *napus*), Sborník vědeckých prací VÚP Troubsko 15: 93-100.

**Kubátová B., Čurn V. (2005):** Soubor metodik a laboratorních protokolů. BC ZF JU a Laboratoř molekulární biologie rostlin KB BF JU, Č. Budějovice.

**Žaludová J., Nix T., Čurn V. (2005):** The utilization of *SCR* gene for detection of self-incompatible plants of *Brassica napus*. - Proc. 27<sup>th</sup> Sci. Conf. Oilseed Crops, Poznan, 12-13.04.2005, p. 63-64.

**Dolanská L., Čurn V. (2004):** Analysis of SLG gene – the molecular marker in hybrid breeding of oil seed rape. – Journal of Central European Agriculture 5: 23-28.

**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(2): 161-173.

**Čurn V., Vyvadilová M., Dolanská L., Kučera V., Sobotka R. (2003):** Utilisation of molecular markers for screening of self-incompatible *Brassica napus* genotypes. – Proc. 11th Int. Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark, 6. - 10. July 2003, pp. 97-99.

**Čurn V., Ovesná J., Sáková L., Sobotka R. (2002):** Identification of oilseed rape cultivars using AFLP markers. [Identifikace odrůd řepky olejně použitím AFLP markerů] – Journal of Central European Agriculture 3: 285-292.

**Sáková, L., Sobotka, R., Čurn, V. (2002):** Molekulární základ sporofytické autoinkompatibility. [Molecular principles of sporophytic self-incompatibility.]. – Biologické listy 67: 41-57.

**Sáková L., Čurn V., Sobotka R. (2000):** Comparison of different DNA isolation methods for RAPD, AFLP and PCR-RFLP analyses. - Coll. Sci. Papers, Fac. Agric. České Budějovice, Ser. Crop Sci., 17: 83-91.

**Sobotka R., Sáková L., Čurn V. (2000):** Molecular mechanisms of self-incompatibility in *Brassica*. – Curr. Issues Mol. Biol., Caister Acad. Press, 2: 103-112.

**Sobotka R., Čurn V., Sáková L. (1998):** Metodické aspekty analýzy polymorfismu S-locusu u řepky. Methodological approach to the analysis of S-locus in oil seed rape. - Sborník Jihočeské univerzity, Zem. Fak. v Č. Budějovicích, Ř. Fytotechnická 15: 41-49.

**Sáková L., Čurn V. (1998):** Identifikace a klasifikace vybraných odrůd brukvovitých plodin a dihaploidních linií řepky pomocí RAPD markerů. – Czech J. Genet. Plant Breed. 34: 61-67.

Název: Čurn V. a kol. (2014): Využití molekulárních technik při selekci rodičovských komponent v programech hybridního šlechtění řepky (*Brassica napus* L.).

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Lenka Havlíčková, Ph.D.  
Ing. Eva Jozová  
Ing. Irena Jelínková  
Mgr. Ing. Ondřej Hejna  
Ing. Vratislav Kučera, CSc.  
Ing. Miroslava Vyvadilová, CSc.  
Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 10.2.2015 (č.j. 5097/2015-MZE-17221), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: [VCurn@seznam.cz](mailto:VCurn@seznam.cz)

ISBN: 978-80-7394-504-6

