



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta



BIOTECHNOLOGICKÉ CENTRUM  
JU ZF ČESKÉ BUDĚJOVICE

## Metodika detekce a molekulární selektce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.)

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“



**Autoři:** prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Božena Kukulíková,  
Ing. Lenka Havlíčková, Ing. Jana Žaludová, Ph.D.

České Budějovice, Listopad 2011



**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta**

**Metodika detekce a molekulární  
selektce AI linií řepky  
(*Brassica napus* L.)**

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Božena Kukulíková  
Ing. Lenka Havlíčková  
Ing. Jana Žaludová, Ph.D.**

**České Budějovice, 2011**

Metodika detekce a molekulární selekce AI linií řepky (*Brassica napus* L.)

Vladislav Čurn a kol.

[vcurn@seznam.cz](mailto:vcurn@seznam.cz)

Biotechnologické centrum ZF JU v Českých Budějovicích, České Budějovice

[www.zf.jcu.cz](http://www.zf.jcu.cz), <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory výzkumného záměru MSM 6007665806 „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“.

*Text: ©2011 Čurn V., Kukolíková B., Havlíčková L., Žaludová J.*

*Foto: ©2011 Čurn V..*

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-253-3

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
Rostlinný materiál používaný pro izolaci DNA řepky .....	7
Metody izolace DNA řepky .....	7
<i>Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)</i> .....	7
<i>Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)</i> .....	8
<i>Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)</i> .....	9
<i>Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)</i> .....	11
<i>SDS extrakce podle Edwardse et al. (1991)</i> .....	12
Porovnání jednotlivých metod izolace DNA .....	15
II.3. Metodika analýzy DNA markerů .....	17
Analýza SLGI .....	17
Analýza SLGII.....	18
PCR-RFLP analýza genů SLG .....	20
Analýza SCR II.....	22
II.4. Metodika elektroforézy DNA .....	25
Elektroforéza v agarózovém gelu .....	25
Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	29
Elektroforéza v SYNERGELu.....	31
Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:.....	32
II.5. Metodika analýzy molekulárních dat.....	33
Digitální obrazová analýza .....	33
<b>III. Srovnání aktuálnosti postupů</b> .....	<b>35</b>
<b>IV. Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>36</b>
<b>V. Seznam použité související literatury</b> .....	<b>37</b>
<b>VI. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>39</b>
<b>VII. Příklady výstupů analýzy molekulárních markerů</b> .....	<b>41</b>



## I. Cíl metodiky

Olejniny jsou vysoce ceněné zemědělské plodiny, jejich význam spočívá jednak ve využívání oleje pro potravinářské a jednak pro průmyslové účely. Díky širokému využití olejů stoupají plochy i intenzita pěstování olejin. Celosvětová produkce olejin činila v roce 2007 344 mil. tun, z tohoto množství připadlo 199 mil. tun na sóju luštinatou a podíl řepky olejné se zvýšil na 38 mil. tun. V Evropě se řepka olejná řadí mezi nejdůležitější olejniny vůbec. A ani Česká republika není výjimkou, zde se řepka olejná pěstuje přibližně na ploše 357 tisíc ha. Řepkový olej je velmi kvalitní téměř srovnatelný s vysoce ceněným olejem slunečnicovým či olivovým, má vhodnou skladbu mastných kyselin. Bylo prokázáno, že skladba mastných kyselin v oleji se může pozměnit (např. snížení obsahu kyseliny erukové, snížení obsahu kyseliny linolenové, i když tento krok se v současné době jeví z pohledu lékařů jako kontraproduktivní, díky pozitivnímu vlivu zmiňované kyseliny na lidský organismus) a v současné době existuje řada šlechtitelských programů zaměřených na získání odrůd s pozměněnou skladbou mastných kyselin dle specifického využití dané odrůdy. Řepka jako rostlina má široký šlechtitelský potenciál, neboť se v porovnání s ostatními olejinami může cíleným šlechtěním rychleji měnit. Jedním z moderních trendů ve šlechtění řepky je hybridní šlechtění, šlechtění hybridů na bázi samčí sterility nebo autoinkompatibility (AI). Unikátní výchozí AI linie dostupné v ČR nesou stabilní, ale resesivní znaky autoinkompatibility a jejich zlepšování a udržování je z tohoto důvodu problematické a zdlouhavé při použití klasických postupů fenotypového výběru a hodnocení. Metodika detekce a následné selekce AI linií řepky založená na analýze molekulárních markerů by měla být účinným nástrojem v rukou šlechtitele pro rychlou a zejména včasnou selekci požadovaných rostlin.



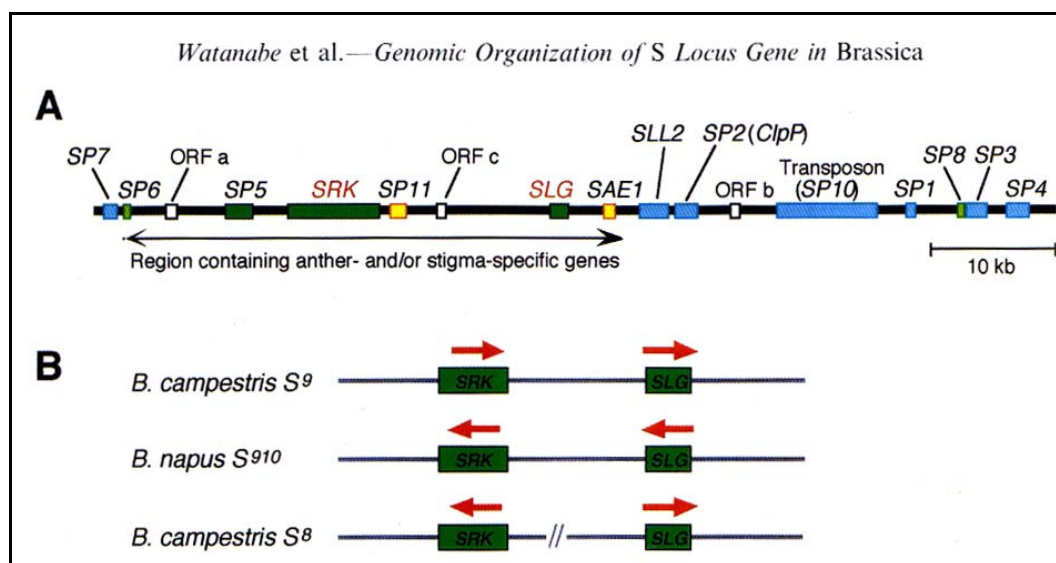


## II. Vlastní popis metodiky

### II.1. Úvod

V současné době je šlechtění řepky zaměřeno na tvorbu  $F_1$  hybridů. Při produkci hybridního osiva je nutné zamezit samosprášení. U řepky je možné využít autoinkompatibility, přirozeně se vyskytujícího systému zabraňujícího opylení vlastním pylem u některých planých druhů rodu *Brassica* i u některých linií *B. napus* (Gowers 1989; Havel 1996). U brukvovitých rostlin jde o 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-alely u rodu *Brassica* jsou podle svého fenotypového účinku na základě klasické genetické analýzy rozděleny na skupinu alel s vysokým stupněm dominance a skupinu považovanou za recesivní (Nasrallah et al. 1991). Na S-lokusu byly identifikovány asi dvě desítky genů, které kosegregují přesně s AI fenotypem (Boyes et al. 1997; Casselman et al. 2000). Za důležité geny účastníky se AI reakce jsou považovány geny *SLG*, *SRK*, a v poslední době se jeví jako významný gen *SCR* (*SP11*). Některé geny ležící na S-lokusu jsou vysoce polymorfní, což je přirozené v případě genů, které se účastní rozpoznávací reakce. Znalost polymorfismů genů S-lokusu lze využít pro odlišení linií, ověření úspěšnosti křížení, zjištění čistoty a heterozygotnosti osiva a zejména pro včasnou detekci inkompatibilních rostlin.



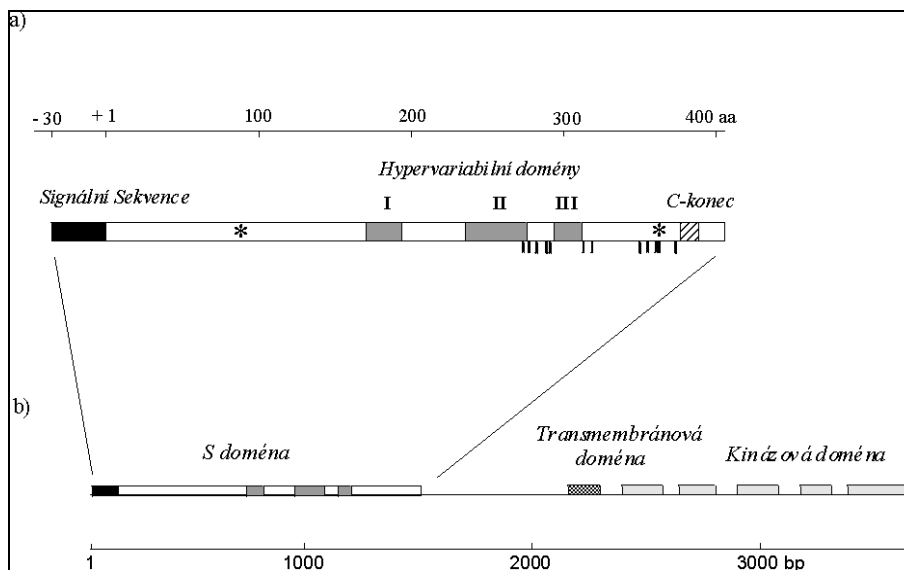
Genomická organizace genů S lokusu u rodu *Brassica* (Watanabe et al. 2000).

V současné době se používá pro analýzu S-alel několik biochemických a molekulárně biologických metod. Používá se např. elektroforetická analýza proteinů (např. produktů genu *SLG*), jejíž nevýhodou je nižší přesnost v případě, že se nepoužívají specifické protilátky pro konkrétní polymorfni protein. Náklady na protilátku jsou velmi vysoké. Dále je významná metoda Southern hybridizace. Tato metoda však vyžaduje dostatek vhodných sond, je také časově a finančně náročná, proto ji nelze použít k rutinnímu testování. Daleko jednodušší, ale přitom velice přesná technika je PCR-RFLP. Je to užitečný nástroj pro předběžnou identifikaci S-haplotypu v rostlinném materiálu (Nishio et al. 1997). Za pomoci metody PCR-RFLP genu *SLG* a segreganční analýzy bylo zjištěno, že *SLG* geny třídy I pocházejí z dominantních haplotypů a *SLG* geny třídy II z recesivních haplotypů (Sobotka 2001). Také u genu *SCR*, jehož produkt je považován za samčí determinant, byla prokázána existence vysokého stupně polymorfismu (Watanabe et al. 2000).

Významné geny S-lokusu:

- *SRK* (S-locus receptor kinase; Stein et al. 1991) gen kóduje transmembránový protein. Je exprimován v blizně a jeví se jako klíčový pro rozpoznávací reakci a AI odpověď. Zjednodušeně lze reakci popsat takto: Po difúzi samčího determinantu do buněčných stěn papilárních buněk blizny se tento determinant naváže na *SRK*. Po té dojde k dimerizaci *SRK* (autofosforylaci), a tím je vyvolána AI odpověď.
- *SLG* (S-locus glycoprotein; Nasrallah et al. 1985) - jeho role není příliš jasná. Protein *SLG* by mohl podporovat proces rozpoznání *SCR* nebo se účastní transportu *SCR* k cytoplazmatické membráně (Takasaki et al. 2000). *SLG* by mohl napomáhat akumulaci *SRK* v papilárních buňkách (Dixit et al. 2000). Bylo potvrzeno, že *SLG* není k AI reakci nezbytně nutný (Takasaki et al. 2000). *SLG* geny byly rozděleny do dvou tříd – třídy I a třídy II.
- *SCR* (S-locus cysteinerich protein; Schopfer et al. 1999), syn. *SP11* (SUZUKI ET AL. 1999), je exprimován pouze v prašnicích. Patří ke skupině PCP proteinů a je považován za samčí determinant AI. Je produkován buňkami tapeta a váže se na protein genu *SLG* bez ohledu na S-haplotyp. Je v genové vazbě s geny *SLG* a *SRK* (Schopfer et al. 1999).

Účinným nástrojem pro šlechtění a selekci žádoucích AI genotypů je postup založený na využití molekulární analýzy. Selekcni markery – *SLG* a *SCR* je možné detekovat v raných fázích ontogeneze a vhodnou kombinací molekulárního a klasického šlechtitelského postupu lze docílit účinné a přesné selekce.



Struktura *SLG* u rodu *Brassica*. Stínovaná políčka reprezentují hypervariabilní oblasti I, II, III. Plná a šrafovaná políčka představují signální sekvenci a C-koncovou variabilní oblast, \* indikuje dokonale konzervovaná potenciální N-vazebná glykosylační místa. Polotučné úsečky představují 12 konzervativních cysteinových zbytků (Kusaba et al. 1997). b) Struktura *SRK*. Stínovaná políčka představují exony (Stein et al. 1991), graficky je zdůrazněná příbuznost mezi genem *SLG* a S-doménou *SRK*.



## II.2. Metodika izolace DNA

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

- děložní lístky (1-2 týdny po vyklíčení)
- plně vyvinuté pravé listy

DNA je izolována dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu (odebraného v laboratoři, 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  $-80^{\circ}\text{C}$ , krátkodobě je možné uchování i při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

### ***Metody izolace DNA řepky***

DNA je izolována materiálu z materiálu čerstvého, 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 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)***

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon – na první koloně dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé koloně dochází k zachycení DNA a jejímu následnému vymytí elučním roztokem.

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogénizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, které můžeme použít je 100 mg.

1. K homogenizovanému vzorku přidáme 400  $\mu\text{l}$  pufru AP1 předeřátého na  $65^{\circ}\text{C}$  a 4  $\mu\text{l}$  RNázy A (20 mg/ml). Důkladně protřepeme na vortexu. Směs inkubujeme 10 min. při  $65^{\circ}\text{C}$ , během inkubace mikrocentrifugační zkumavku 2–3x převrátíme.
2. Přidáme 130  $\mu\text{l}$  pufru AP2, promícháme a inkubujeme 5 min. na ledu.
3. Lyzát přeneseme do QIAshredder kolonek a centrifugujeme 2 min. při 8000 rpm. Při pipetování lyzátu do kolonek je nutné odstříhnout špičku pipety. Přes filtr projde do sběrné nádoby i malá část mrtvých buněčných pletiv a sraženin, kde vytvoří pelet.
4. Supernatant přeneseme do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Většinou získáme 450  $\mu\text{l}$  supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.

5. Přidáme 0,5 dílu pufru AP3 a 1 díl etanolu (96–100 %) a promícháme pomocí pipety. Př.: 450 µl supernatantu + 225 µl pufru AP3 + 450 µl etanolu.
6. 650 µl směsi z kroku 5 (včetně sraženin) přeneseme do DNeasy kolonek, centrifugujeme 1 min. při  $\geq 8000$  rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
7. Opakujeme krok 6 se zbývajícím vzorkem, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky.
8. DNeasy kolonky umístíme do nových centrifugačních zkumavek, přidáme 500 µl pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 1 min. při  $\geq 8000$  rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
9. Přidáme 500 µl pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 2 min. při maximálních otáčkách až do vysušení membrány v kolonce, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky. DNeasy kolonky vyndáme opatrně z centrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku etanolem obsaženým ve filtrátu.
10. DNeasy kolonky přeneseme do 1,5 ml (2 ml) mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100 µl pufru AE (zahřátého na 65°C) přímo na membrány kolonek a centrifugujeme 1 min. při  $\geq 8000$  rpm. Eluci můžeme zopakovat (do nové mikrocentrifugační zkumavky).

#### Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

#### Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

### ***Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)***

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon. Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogenizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, kterého můžeme použít je 100 mg.

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme cca 60 mg rostlinného pletiva. Homogenát přeneseme do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 400 µl Lysis Buffer P a 20 µl proteinázy K. Vortexujeme a necháme 30 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace 2 – 3krát promícháme. Připravíme si Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube.
2. Vzorky přeneseme na Spin Filter. Centrifugujeme 10 min. při 12000 rpm. Pokud je to nutné přidáme 40 µl Rnázy A (10 mg/ml), vortexujeme a necháme 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
3. Přidáme 200 µl Binding Buffer P a vortexujeme.

- Umístíme nové Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube, přeneseme vzorky a 1 min. inkubujeme. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm.
- Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
- Přidáme 550  $\mu$ l Wash Buffer I a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
- Přidáme 550  $\mu$ l Wash Buffer II a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok opakujeme. Nakonec centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.
- Spin Filter umístíme do nových 1,5 ml Receiver Tube a přidáme 50 – 100  $\mu$ l Elution Buffer D předehřátého na 65°C. Inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidáme 50  $\mu$ l Elution Buffer D předehřátého na 65°C a inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm. Postup opakujeme znovu s dalšími 50  $\mu$ l Elution Buffer D, ale do nové 1,5 ml Receiver Tube. Vznikne nám tak 50  $\mu$ l 1. a 2. eluátu.

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

### ***Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)***

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

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.

- Připravíme si roztok 2x CTAB a 1 % merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500  $\mu$ l roztoku. Připravený roztok dáme předehřát na 65°C.
- 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.

- V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x CTAB a 1 % merkaptoethanolu.
- 3. Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l předeřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufr. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
- 4. Přidáme 500  $\mu$ l směsi fenol–chloroform–IAA, 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
- 5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 500  $\mu$ l směsi chloroform–IAA, 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). 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant. Pelet usušíme.
- 7. Přidáme 300  $\mu$ l 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
- 8. Přidáme 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 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 (pipetujeme 2x). Necháme dobře usušit.
- 10. Přidáme 400  $\mu$ l ledového 70 % ethanolu. 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant. Vzorky necháme dobře usušit (cca 10 min.).
- 11. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200  $\mu$ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

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 CTAB extrakční pufr (2 % CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1 % 2-merkaptoetanol)
- 2-merkaptoethanol
- fenol–chloroform–IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform–IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný
- 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 CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)***

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely AFLP analýzy. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon) odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) 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.

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1 % merkaptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500  $\mu$ l roztoku. Připravený roztok dáme předeřhát 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.
  - V případě lyofilizátu je vhodné tento krok provádět v 10 ml centrifugačních tubách a na 100 mg lyofilizátu přidat 5 ml roztoku 2x PVP–CTAB a 1 % merkaptoethanolu.
3. Ke každému vzorku přidáme 500  $\mu$ l předeřhátého 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 chloroformu–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 všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 µl 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpustit 40 min. při 37°C).

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 µl 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

#### ***SDS extrakce podle Edwardse et al. (1991)***

Rostlinné pletivo můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme rostlinné pletivo homogenizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství rostlinného pletiva, které můžeme použít je 500 mg.

1. 0,5 g listového pletiva homogenizujeme ve 100 µl extrakčního pufru v mikrocentrifugační zkumavce.

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 mikrocetrifugační zkumavky.
4. K supernatantu přidáme 300  $\mu$ l isopropanolu vychlazeného na  $-20^{\circ}\text{C}$  a směs necháme 2 min. srážet. Centrifugujeme 5 min. při 13000 rpm.
5. Osušený pelet rozpustíme ve 100  $\mu$ l TE pufru. DNA je stabilní ve  $4^{\circ}\text{C}$  déle než 1 rok.

#### Chemikálie:

- kapalný dusík
- 200 mM Tris–HCl (pH=7,5)
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 0,5 % SDS
- chloroform–IAA (24 : 1)
- isopropanol
- TE pufr (10 mM Tris–HCl, pH=7,5; 0,1 mM EDTA)

#### Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř



## Porovnání jednotlivých metod izolace DNA

Vzhledem k tomu, že techniky analýzy DNA markerů mají být rutinně používány v běžné praxi pro identifikaci a odlišení AI a AK linií, je pro šlechtitele zásadní, aby byla k tomuto účelu vypracována taková metoda extrakce DNA, která bude optimalizována pro toto cílové uplatnění. Za optimální je považována taková metoda, která bude na straně jedné manuálně i ekonomicky nenáročná a na straně druhé bude poskytovat dostatečný výtěžek DNA, který bude popřípadě použitelný i pro další hodnocení pomocí jiných např. metod genetického markerování. Pomocí vybrané „kompromisní“, ale optimalizované metody pak je možné zpracovat maximální počet vzorků za jednotku času (např. denně, týdně) při uspokojivé kvalitě DNA a za současné ekonomické únosnosti.

Pro volbu vhodné techniky extrakce DNA byly použity dva druhy rostlinného materiálu: 1/ čerstvé pletivo z děložních lístků, 2/ zdravé čerstvé listy vzrostlé rostliny. Kromě izolace z čerstvé hmoty byla prováděna izolace ze zamraženého materiálu jednak při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  a jednak  $-80^{\circ}\text{C}$ .

V následující tabulce jsou porovnány sledované charakteristiky při hledání optimální metody izolace DNA.

Metoda	Cena [Kč]	Doba izolace [h]	Počet vzorků na den**	Pracnost ***	Práce s fenolem	Výtěžek roztoku DNA [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace roztoku DNA [ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Výtěžek DNA [ng]
CTAB	10	8 (2dny)*	2 x 24	3	ne	10 - 100	200-400	2-40
CTAB+PVP	11	8 (2dny)*	2 x 24	3	ne	10 - 100	200-400	2-40
SDS	7	4 -6	2 x 24	2	ne	10 - 100	1-10	0,1-1
INVITEK	72	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	0,5-1	0,05-0,1
QIAGEN	120	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	0,5-1	0,05-0,1

\* osm hodin, ale rozloženo do dvou dnů

\*\* standardní laboratoř, 1 pracovní linka, 1 centrifuga s rotorem pro 24 mikrozkušavek

\*\*\* 1 – nejméně náročné, 3 – nejnáročnější postup

Bylo testováno pět metod extrakce DNA: tři klasické metody izolace DNA - izolace rostlinné DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992) a pomocí CTAB s přidáním PVP, SDS extrakce (Edwards et al. 1991); a dvě metody, při nichž byl používán komerčně dodávaný kit pro izolaci rostlinné DNA Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK) a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

Podle sledovaných charakteristik byla jako optimální metoda pro účely analýzy rozlišení AI a AK (PCR při SLG I a SCR II genů) vybrána izolace pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK), která i přes nejvyšší cenu za vzorek nejlépe splňovala sledované vlastnosti. Vysoká cena byla vyvážena faktem, že jsou získány standardní vzorky DNA, opakovatelně a reprodukovatelně u celého spektra zkoušených šlechtitelských materiálů. DNA je získána v kvalitě, která následně umožňuje bezproblémovou analýzu širokého spektra DNA markerů.

V této metodě jsou spojeny požadavky na jednoduchou standardní a rychlou metodu, kterou bude moci uplatňovat v běžné praxi.

Při srovnání izolace DNA z listů v různých růstových fázích byly nalezeny rozdíly, mladé děložní lístky poskytovaly kvalitnější DNA, ale i DNA z listů z plně vyvinutých rostlin byla dostatečně kvalitní pro další zpracování, musí však být kladen velký důraz na správné odebírání listové hmoty, odebírat jen absolutně zdravé, nezažloutlé listy. Možnost odběru listů i pozdější růstové fázi umožňuje provedení analýzy z materiálu odebíraného přímo ze šlechtitelských parcel.

## II.3. Metodika analýzy DNA markerů

### **Analýza SLGI**

Gen *SLG* patří mezi tři známé vysoce polymorfní geny S-lokusu. Spolu s genem *SRK* se exprimuje v bliznách. *SLG* geny třídy I pocházejí z dominantních haplotypů (Okazaki et al. 1999). Detekce přítomnosti genu *SLG* třídy I v analyzovaném materiálu řepky je založena na PCR technice - amplifikaci specifického fragmentu o velikosti cca 1 330 pb (Sobotka 2001) za použití primerů PS5 a PS15 (Nishio et al. 1996).

Sekvence specifických primerů pro analýzu genu *SLG* I

primer	sekvence (5'→3')
PS 5	ATG AAA GGC GTA AGA AAA ACC TA
PS 15	CCG TGT TTT ATT TTA AGA GAA AGA GCT

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru (10 mM Tris-HCl, pH=8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100), 100 µM dNTP, 10 pM primeru, 1 U Taq polymerázy (TAKARA) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém TAKARA:

- 2,5 µl 10x reakčního pufru
- 2,0 µl dNTPs
- 1 µl DNA
- 0,25 µl PS5 + 0,25 µl PS15 specifických primerů
- 0,2 µl DNA polymerázy (1 U)
- 18,8 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Alternativně je možné použít komerčně dodávané „master mixy“. PCR reakce pak probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 µM dNTP, 10 pM primeru, 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,25 µl PS5 + 0,25 µl PS15 specifických primerů
- 11 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 5 min 94°C
- 35 cyklů:
  - 1 min 93°C
  - 2 min 58°C
  - 3 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. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Profily markerů se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

PCR fingerprinty se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; UltraQuant, UltraLum) a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl<sub>2</sub> nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické 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

## **Analýza SLGII**

Gen *SLG* patří mezi tři známé vysoce polymorfní geny S-lokusu. Spolu s genem *SRK* se exprimuje v bliznách. *SLG* geny třídy II pocházejí z recesivních haplotypů (Okazaki et al. 1999). Detekce přítomnosti genu *SLG* třídy I v analyzovaném materiálu řepky je založena na PCR technice - amplifikaci specifického fragmentu o velikosti cca 1 100 pb (Sobotka 2001) za použití primerů PS3 a PS21 (Nishio et al. 1996).

Sekvence specifických primerů pro analýzu genu *SLG* II

primer	sekvence (5' → 3')
PS 3	ATG AAA GGG GTA CAG AAC AT
PS 21	CTC AAG TCC CAC TGC TGC GG



PCR reakce probíhá v objemu 25  $\mu$ l, v 1x reakčním pufu (10 mM Tris–HCl, pH=8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100), 100  $\mu$ M dNTP, 10 pM primeru, 1 U Taq polymerázy (TAKARA) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém TAKARA:

- 2,5  $\mu$ l 10x reakčního pufu
- 2,0  $\mu$ l dNTPs
- 1  $\mu$ l DNA
- 0,25  $\mu$ l PS3 + 0,25  $\mu$ l PS21 specifických primerů
- 0,2  $\mu$ l DNA polymerázy (1 U)
- 18,8  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25  $\mu$ l)

Alternativně je možné použít komerčně dodávané „master mixy“. PCR reakce pak probíhá v objemu 25  $\mu$ l, v 1x reakčním pufu (75 mM Tris–HCl, pH=8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu$ M dNTP, 10 pM primeru, 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5  $\mu$ l PPP master mixu
- 1  $\mu$ l DNA
- 0,25  $\mu$ l PS3 + 0,25  $\mu$ l PS21 specifických primerů
- 11  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25  $\mu$ l)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- |                        |        |      |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 5 min  | 94°C |
| • 35 cyklů:            | 1 min  | 93°C |
|                        | 2 min  | 58°C |
|                        | 3 min  | 72°C |
| • konečná elongace     | 10 min | 72°C |
| • stop                 | -      | 4°C  |

PCR produkty se rozdělují na 1,5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufu. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Profily markerů se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

PCR fingerprinty se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; UltraQuant, UltraLum) a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl<sub>2</sub> nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické 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

### **PCR-RFLP analýza genů SLG**

Metoda PCR-RFLP je používána k detekci polymorfismu a identifikaci jednotlivých S alel, tj. k určení specifického S-haplotypu. Na základě PCR analýzy lze určit, zda daný genotyp obsahuje příslušný gen (gen *SLG* třídy I nebo II) a na základě zjištěné korelace přítomnosti genu a fenotypu lze určit AK nebo AI fenotyp analyzované rostliny. Nicméně tato metoda neumožňuje určit S-haplotyp a zjistit, zda různé genotypy nesou stejné nebo odlišné S alely. Pro identifikaci S-haplotypu lze v zásadě použít dvě techniky – sekvenování (časově a finančně náročný přístup, lze určit přesnou sekvenci amplifikovaného fragmentu) a PCR-RFLP analýzu (alternativní rychlý postup, detekuje specifický polymorfismus, úroveň rozlišení je pro screeningové účely a selekci šlechtitelského materiálu dostatečná).

Pro PCR-RFLP analýzu jsou využívány PCR produkty z genomické DNA s použitím S-lokus sekvenčně specifických primerů (případně zaklonované fragmenty po amplifikaci *SLG*), které jsou štěpeny různými restriktčními enzymy a detekce fragmentů je prováděna na gelové elektroforéze (Brace et al. 1993; Brace et al. 1994; Nishio et al. 1996; Nishio et al. 1997; Park et al. 2001; Park et al. 2002). Tento typ markeru byl popsán jako "cleaved amplified polymorphic sequences" (CAPS) (Konieczny a Ausubel 1993). Nishio et al. (1996) vytvořil katalog S-haplotypů pro linie *B. rapa* po štěpení restriktázou *AfaI* na PCR produkty amplifikovanými s primery pro třídu I.

Metodu PCR-RFLP lze používat rutinně pro odlišení S-haplotypů, a to již v časně fázi ontogeneze. Toho je možné využít ke zvolení vhodné kombinace v hybridním šlechtění řepky na bázi autoinkompatibility, pro odlišení rodičovských populací a pro stanovení hybridnosti potomstva.

Metoda se skládá ze dvou částí:

I. Amplifikace specifického fragmentu genu *SLG* I nebo *SLG* II (viz. předchozí protokoly).

II. Štěpení příslušného fragmentu pomocí specifických restričních endonukleáz.

Pro štěpení jsou používány restriční endonukleázy *Mbol*, *EcoRI*, *MspI* a *AfaI* (*RsaI*).

Po ukončení PCR (PCR detekce genu *SLG* I nebo *SLG* II) se část objemu reakční směsi použije pro RFLP analýzu. K tomuto objemu je přidán pufr pro příslušnou restriční endonukleázu, 5 U restričního enzymu, BSA (zlepšuje provedení restričního štěpení, množství je nutno optimalizovat dle restriktázy a použitého RE pufru, 1  $\mu$ l je vhodný u restriktáz NEB) a probíhá štěpení amplifikovaného fragmentu.

Příprava reakce pro restriční analýzu:

- 22  $\mu$ l PCR reakční směsi
- 2,5  $\mu$ l 10x RE reaction buffer (pufr dodávaný společně s RE)
- 0,5-1  $\mu$ l restriční endonukleázy ( $\approx$  5 U)
- $\pm$  1  $\mu$ l 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)

Štěpení probíhá při teplotě 37°C po dobu 4 hodin v termostatu nebo lépe v termocykleru. Produkty (naštěpené fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Kvalitnějšího rozdělení je dosaženo na 2 % Synergelu nebo 10 % PAGE. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Fingerpriny se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System. Fingerpriny se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; UltraQuant, UltraLum) a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

pro PCR analýzu

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl<sub>2</sub> nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické primery
- dH<sub>2</sub>O (PCR dH<sub>2</sub>O, nebo Millipore dH<sub>2</sub>O)

pro RFLP analýzu

- PCR reakce
- restriční endonukleáza
- pufr pro restriční endonukleázu

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, termostat

## Analýza SCR II

Gen *SCR* syn. *SP11* (Suzuki et al. 1999) je třetí gen S lokusu (nazývaný též samčí determinant) podílející se na AI reakci a představuje samčí ligand. Tento gen byl objeven v roce 1999 (Suzuki et al. 1999), je vázán na S lokus, specificky se exprimuje v obalu pylových zrn a je vysoce polymorfní. Svůj název dostal podle osmi konzervativních cysteinových zbytků, které mu dávají charakteristickou 3D strukturu. Detekce přítomnosti genu *SCR* v analyzovaném materiálu řepky je založena na PCR technice - amplifikaci specifického fragmentu o velikosti cca 280 pb (Žaludová 2007) při použití specifických primerů (Shiba et al. 2002; Žaludová 2007).

Sekvence specifických primerů pro analýzu genu *SCR* II

primer	sekvence (5'→3')
SCRIIa	GCG AAA ATC TTA TAT ACT CAT AAG
SCRIIb	TTC GTT GAT CAA TTA TGA TT
SCRII_1a	TTTGATTTTGACATATGTTC
SCRII_1b	CCCCTCAACTTCATAGTGTT
SCRII_2a	TTGGACTTTGACATATGTTC
SCRII_2b	CTCTGAAGTGGGTTTTACAG

Gen *SCR* je amplifikován za použití primerů specifických pro třídu II genu *SCR* z genomické DNA, primery SCRIIa a SCRIIb (Shiba et al. 2002). Alelicky specifická amplifikace je docílena použitím alelicky specifických primerů (alela 1: primery SCRII\_1a a SCRII\_1b; alela 2: primery SCRII\_2a a SCRII\_2b).

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru (10 mM Tris-HCl, pH=8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100), 100 µM dNTP, 10 pM primeru, 1 U Taq polymerázy (TAKARA) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém TAKARA:

- 2,5 µl 10x reakčního pufru
- 2,0 µl dNTPs
- 1 µl DNA
- 0,25 µl + 0,25 µl specifických primerů
- 0,2 µl DNA polymerázy (1 U)
- 18,8 µl dH<sub>2</sub>O (voda do objemu 25 µl)

Alternativně je možné použít komerčně dodávané „master mixy“. PCR reakce pak probíhá v objemu 25  $\mu$ l, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris–HCl, pH=8.8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 % Tween 20, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 200  $\mu$ M dNTP, 10 pM primeru, 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5  $\mu$ l PPP master mixu
- 1  $\mu$ l DNA
- 0,25  $\mu$ l + 0,25  $\mu$ l specifických primerů
- 11  $\mu$ l  $\text{dH}_2\text{O}$  (voda do objemu 25  $\mu$ l)

Amplifikace probíhá na MJ Research Thermocycler PTC 100, nebo Biometra T1 Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 5 min 94°C
- 45 cyklů: 30 s 94°C  
30 s 55°C  
1 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop - 4°C

Předpokládaná velikost amplifikovaných produktů je 450 bp při použití SCR class II univerzálních primerů (SCRIIa a SCRIIb) a 280 bp při použití alelicky specifických primerů.

PCR produkty se rozdělují na 1,5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Fingerprinty se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System.

PCR fingerprinty se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; UltraQuant, UltraLum) a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr,  $\text{MgCl}_2$  nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické primery
- $\text{dH}_2\text{O}$  (PCR  $\text{dH}_2\text{O}$ , nebo Millipore  $\text{dH}_2\text{O}$ )

Přístroje:

- PCR thermocycler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák



## II.4. Metodika elektroforézy DNA

Klasickou metodou, univerzálně používanou k rozdělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporné elektrody směrem ke kladné. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. Fragmenty o stejné délce postupují stejně rychle a vytvoří proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se dovnitř dvoušroubovice a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, gely jsou po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě.

### ***Elektroforéza v agarózovém gelu***

Příprava gelu:

1. Agaróza se smíchá s vodou a pufrům v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozvaří se v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max výkon, nesmí zpěnit); agaróza musí být dokonale rozpuštěná, během rozváření je nutné s Erlenmayerovou baňkou několikrát zamíchat.
2. Roztok agarózy je třeba zchladit na cca 55°C, přidá se odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promíchá a nalije se do připravené vaničky; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu je nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny je zapotřebí eliminovat.
3. Po nalití agarózy je se do vaničky umístí hřebínek a gel se nechá 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je umístěn do elektroforetické vany a pod hladinu pufru jsou do jamek vkládány vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky se naplní dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25  $\mu$ l) se přidá 4  $\mu$ l nanášecího pufru (LB), promíchá se špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně je možné nanést vzorky na gel a poté opatrně vložit gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25 % bromfenolové modři, 40 % (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpípetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 1 µl markeru, 10 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 23 V po dobu 30 min. a poté 90 V po dobu 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- gel je položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotografováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

Tab. 5a: Složení 0,7 % agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 0,7 % agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [µl]
50	0,35	49	1	5
100	0,7	98	2	8
150	1,05	147	3	8-10
200	1,4	196	4	12-13

Tab. 5b: Složení 0,7 % agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 0,7 % agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [µl]
50	0,35	40	10	5
100	0,7	80	20	8
150	1,05	120	30	8-10
200	1,4	160	40	12-13



Tab. 6a: Složení 1,5 % agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 1,5 % agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	0,75	49	1	5
100	1,5	98	2	8
150	2,25	147	3	8-10
200	3	196	4	12-13

Tab. 6b: Složení 1,5 % agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 1,5 % agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	0,75	40	10	5
100	1,5	80	20	8
150	2,25	120	30	8-10
200	3	160	40	12-13

Tab. 7a: Složení 3,0 % agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 3 % agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	1,5	49	1	5
100	3	98	2	8
150	4,5	147	3	8-10
200	6	196	4	12-13

Tab. 7b: Složení 3,0 % agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 3 % agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	1,5	40	10	5
100	3	80	20	8
150	4,5	120	30	8-10
200	6	160	40	12-13

Tab. 8: Příprava pracovních roztoků TAE a TBE pufrů.

1x pufr TAE/TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 9: Složení zásobních roztoků TAE a TBE pufrů

	50x TAE	5x TBE
Tris (Trizma)	242 g	54
0,5 M EDTA	100 ml	20 ml
led. kys. octová	57,1 ml	-
kys. boritá	-	27,5
dH <sub>2</sub> O	voda do 1 L	voda do 1 L

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TAE/TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

## **Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Příprava gelu:

1. Důkladně umyjeme elektroforetická skla (ve vodě a poté je otřeme ethanolem), sestavíme aparaturu do „nalévacího stojánku“.
2. Ze zásobních roztoků připravíme směs – AC/BIS + voda + gelový pufr + siřičitan, promícháme a přidáme persíran a TEMED, důkladně promícháme, ale vyvarujeme se tvorby bublin v roztoku! a IHNED!!! nalijeme nebo 5 ml automatickou pipetou nanese mezi sestavená skla; roztok může i velmi rychle „tuhnout“; vložíme hřebínek a necháme min 1 hod. polymerovat.
3. Poté vyjmeme hřebínek, jamky propláchneme elektroforetickým pufrem, nanese vzorky a sestavíme komplet elektroforézy.
4. Nalijeme elektroforetické pufr a probíhá elektroforéza.
5. Po ukončení elektroforézy opatrně oddělíme skla, vyjmeme gel a přeneseme jej do barvicí směsi (200 ml elektroforetického pufru a 20  $\mu$ l roztoku ethidium bromidu); barvení probíhá 10–30 min. a poté jsou fragmenty vizualizované na UV transiluminátoru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25 % bromfenolové modři, 40 % (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpíjetuje do mikrocetrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 1  $\mu$ l markeru, 10  $\mu$ l vody, 2  $\mu$ l LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 50 V po dobu 30 min. a poté 220 V po dobu 2,5 – 3 hod.

Vizualizace DNA:

- po obarvení je gel položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotografováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

akrylamid je neurotoxický a kancerogenní, při práci s roztoky a gely je třeba dbát zvýšené opatrnosti a používat ochranné pomůcky! zvláštní opatrnosti je třeba zejména při přípravě zásobních roztoků (práce s rouškou v digestoři)

Tab. 10: Složení nedenaturačního gelu pro elektroforézu DNA.

		<b>nedenaturační gel</b>	
		<b>SEPARAČNÍ GEL (7.5 %)</b>	<b>SEPARAČNÍ GEL (10 %)</b>
redestilovaná	ml	37,5	31,5
voda	ml	15	20
AC/BIS	ml	7,5	7,5
pufr A nebo A'	μl	160	160
siřičitan sodný	μl	300	300
persíran amonný	μl	30	30
TEMED			
<b>AC/BIS:</b>		30 g acrylamid + 0,8 g BIS / 100 ml	
<b>pufr A:</b>		7,27 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH=7,5 / 100 ml	
<b>pufr A':</b>		36,3 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH=8,8 / 100 ml	
<b>pufr B:</b>		6 g Tris, 48 ml 1 M HCl, pH=6,8 / 100 ml	
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> :</b>		nasycený vodný roztok	
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:</b>		15 % roztok	
<b>SDS:</b>		10 % roztok	
<b>elektrodový pufr 1:</b>		9,27 g kys. boritá, NaOH do pH=7,2 / 1000 ml	

AC/BIS	uchovávat ve tmě a chladnu, roztok stálý cca 3 týdny
gelové pufrы	uchovávat ve tmě a chladnu, stálé
persíran	lze uchovávat ve tmě a chladnu 1 týden
elektrodový pufr 1	připravovat před použitím

Chemikálie:

- akrylamid a bis-akrylamid (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- roztoky pufrů
- nasycený vodný roztok siřičitanu sodného
- persíran amonný
- TEMED
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- jednotka vertikální elektroforézy se zdrojem, sada pro nalévání gelů, sada automatických pipet

*Alternativním postupem pro DNA PAGE je využití čipové elektroforézy Experion (Bio-Rad) s čipy pro elektroforézu DNA. Postup je velmi rychlý, dostatečně citlivý a precizní, nevýhodou je nutnost pořízení nákladné investice.*

## **Elektroforéza v SYNERGELu**

Synergel je přípravek, který po smíchání s agarózou vytváří gel a výrazně zvyšuje separační možnosti agarózového gelu. Separované fragmenty DNA vytváří ostré pruhy, dobře rozdělené. Je používán zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE gelu je zachována jednoduchost přípravy a provedení gelu a jeho netoxičnost.

Výpočet množství synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci synergelu vypočítáme na základě následujícího vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

kde A je koncentrace agarózového gelu bez přídavku synergelu, který chceme převést na synergel/agarózový gel

0,7 – je hodnota koncentrace základního agarózového gelu

např. v případě, kdy standardní 3 % agarózový gel nahražíme gelem s přídavkem synergelu je složení gelu následující:

$$A = 3 \%$$

množství synergelu ve směsi:  $(3 - 0,7) / 2 = 1,15 \%$

1,15 % synergelu přidáme k 0,7 % agaróze, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g synergelu a 1,75 g agarózy

Postup přípravy Synergel/agarózového gelu:

- Navážíme daná množství agarózy a synergelu.
- Přidáme takové množství 96 % ethanolu, aby došlo k rozmíchání (nesmí se tvořit hrudky).
- Přidáme 250 ml 0,5x TBE pufru.
- Rozvaříme v mikrovlnné troubě.
- Přidáme 5 µl roztoku ethidium bromidu.
- Důkladně promícháme.
- Nalijeme do vany / formy na gel.
- Necháme ztuhnout – cca 1–1,5 hod.

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- Synergel (Roth)
- ethanol (čistý, 96 % ethanol nedenaturovaný)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

**Detekce DNA pomocí SYBR GREEN:**

V případě použití barviva SYBR GREEN (nižší toxicita, lepší vizualizace DNA gelu, nižší pozadí) se při přípravě gelu nepoužívá ethidium bromid. Po ukončení PCR je ke vzorkům DNA přidán nanášecí pufr (LB) se SYBR GREEN. Vzorky jsou nanášeny na gel a probíhá elektroforéza. Po ukončení elektroforézy probíhá vizualizace DNA fragmentů/PCR produktů na UV transiluminátoru. V případě dokumentace gelů pomocí kamery nebo fotoaparátu je nutné použití zeleného filtru namísto červeného filtru používaného u gelů barvených ethidium bromidem !

LB se SYBR GREEN:      0,025 g Bromphenol Blue  
                                 0,025 g Xylene Cyanol FF  
                                 3 ml glycerol  
                                 20 µl SYBR GREEN (koncentrovaný roztok, FLUKA)  
                                 doplnit dH<sub>2</sub>O do 10 ml

rozpipetovat do alikvot a skladovat v temnu při -20°C, krátkodobě lze skladovat i při +4°C

## II.5. Metodika analýzy molekulárních dat

### ***Digitální obrazová analýza***

Vyhodnocování získaných elektroforeogramů:

Pro vyhodnocování výsledků po elektroforéze - tj. proteinových spekter molekulárních markerů je používána řada metod. Mezi jednodušší metody vhodné při malém množství analyzovaných vzorků, malém počtu proužků je ruční proměření gelů a stanovení relativní pohyblivosti jednotlivých pruhů nebo po srovnání s velikostním markerem, jejich velikosti (délky udané v pb).

Poměrně dokonalých výsledků lze dosáhnout po důkladnější (ale značně časově náročné) obrazové analýze gelů. Jsou dostupné komerčně dodávané záznamové jednotky (scanery, příp. zařízení na bázi CCD kamery, s obslužným a vyhodnocovacím softwarem - BioRad, Image Laboratory, Stratagene), ale výsledků obdobné kvality lze dosáhnout i s méně finančně náročným zařízením.

Na našem pracovišti využíváme komplexní počítačové zpracování gelů - při využití barevného stolního scanneru s vysokou rozlišovací schopností (min 600 dpi) nebo digitálního fotoaparátu jako součásti GelDocumentation System. Po digitalizaci jsou gely zpracovány pomocí speciálního software - GelManager® for Windows (BioSystematica, U.K.), BioProfil 1D++ (Vilber Lourmat, Francie) nebo UltraQuant 6.0 (UltraLum, Inc., USA).

Tyto programy pro digitální obrazovou analýzu a zpracování elektroforetických gelů umožní analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňují konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány. Využití má zejména v epidemiologických studiích, identifikaci genotypů, systematice, ekologii, populační genetice, klinické biochemii a biotechnologických aplikacích.

Postup obrazové analýzy gelů:

Následující kroky představují kostru postupu počítačového zpracování a vyhodnocování elektroforeogramů

- záznam gelu ze scanneru nebo digitálního fotoaparátu/kamery
- úprava a optimalizace "obrázku" - záznamu gelu
- výběr pozice vzorku a záznam křivky optické hustoty vzorku
- odstranění pozadí
- korekce absorbančních profilů na základě referenčních spekter
- kontrola a korekce pozice píků (proužků)
- porovnání profilů (korelací profilů nebo porovnáním pozice proužků)
- výpočet matice podobnosti (koeficienty podobnosti)
- výpočet a grafické znázornění pomocí dendrogramu
- identifikace nového spektra porovnáním s databází

## Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení molekulárních markerů je vhodné využít statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představuje prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu je možné sestavit matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení (výpočet frekvence alel, výpočet koeficientů genetické identity, výpočty genetických vzdáleností či podobností, clusterová /UPGMA – unweighted pair group method averages/ a ordinační /PCO – Principal Coordinates Analysis/ analýza a sestavení dendrogramů a ordinačních diagramů). Pro tyto účely je využíván program Statistica 6.0 (Statsoft) a MVSP (Kovach Comp. Serv.) (z důvodu možnosti výpočtu genetické distance dle Nei-Li metriky koeficientů podobnosti).



### III. Srovnání aktuálnosti postupů

Předkládanou „Metodiku detekce a molekulární selekce AI linií řepky (*Brassica napus* L.)“ lze hodnotit jako novou metodiku, protože v současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zahrnující optimalizované pracovní postupy pro izolaci DNA a analýzu molekulárních markerů autoinkompatibility u řepky. Dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích, které se zabývají problematikou analýzy S lokusu na molekulární úrovni, většina prací je pak prováděna na modelech (*B. rapa* nebo *B. oleracea*), komplexní vyhodnocení použitelnosti jednotlivých 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, na straně druhé pak má i své limity. Reálná interpretace molekulárních dat pak vyžaduje volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Využití molekulárního markeru pro selekci požadovaných genotypů je předmětem předkládané metodiky.

## IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika detekce a molekulární selekce AI linií řepky (*Brassica napus* L.) uvádí optimalizované postupy pro izolaci DNA, uvádí nejen přehled jednotlivých metod, ale je poukázáno i na přednosti jednotlivých metod a metody jsou vyhodnoceny z pohledu rychlosti a pracnosti provedení, kvantity a kvality získané DNA. Ve druhé části jsou pak představeny základní techniky a metody určené pro analýzu selekčních markerů.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů AI u řepky. Výstupem analýzy je pak spektrum markerů (amplifikovaných fragmentů DNA) použitelné pro selekci požadovaných genotypů. Molekulární markery nejsou dosud standardně pro tyto účely používány, mohou být ale vhodným doplňkem morfologické a cytologické analýzy a fenotypového (semenného) testu. 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 biotechnologické firmy Fubatech, s.r.o., Raduň. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## V. Seznam použité související literatury

- Boyes D.C., Nasrallah M.E., Vrebalov J., Nasrallah J.B. (1997): The self-incompatibility (S) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell* 9: 237-247.
- Brace J., Ockendon D.J., King G.J. (1993): Development of a method for identification of S alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. *Sex. Plant Reprod.* 6: 133-138.
- Brace J., King G.J., Ockendon D.J. (1994): A molecular approach to the identification of S alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant Reprod.* 7: 203-208.
- Casselmann A.L., Vrebalov J., Conner J.A., Singal A., Giovanni J., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. (2000): Determining the physical limits of the *Brassica* S locus by recombinational analysis. *Plant Cell* 12: 23-33.
- De Nettancourt D. (1977): Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Dixit R., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. (2000): Post-transcriptional maturation of the S receptor kinase of *Brassica* correlates with co-expression of the S-locus glycoprotein in the stigmas of two *Brassica* strains and in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 124: 297-311.
- Edwards K., Jihnstone C., Thompson C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.
- Gowers S. (1989): Self-incompatibility interactions of *Brassica napus*. *Euphytica* 42: 99-103.
- Havel J. (1996): Získávání autoinkompatibilních linií u řepky ozimé. *Genet. a šlecht.* 32: 9-18.
- Konieczny A., Ausubel F. (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype specific PCR based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Kusaba M., Nishio T., Satt Y., Hinata K., Ockendon D. (1997): Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implication for evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7673-7678.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Nasrallah J.B., Kao T.H., Goldberg M.L., Nasrallah M.E. (1985): A cDNA clone encoding an S-locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* 318: 263-267.
- Nasrallah J.B., Nishio T., Nasrallah M.E. (1991): The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 393-422.
- Nishio T., Kusaba M., Sakamoto K., Ockendon D.J. (1997): Polymorphism of the kinase domain of the S-locus receptor kinase gene (*SRK*) in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* 85: 335-342.

- Nishio T., Kusaba M., Watanabe M., Hinata K. (1996): Registration of S alleles in *Brassica campestris* L. by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor. Appl. Genet.* 92: 1329-1334.
- Ockendon D.J. (1974): Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open-pollinated cultivars of Brussel sprouts. *Heredity* 33: 159-171.
- Okazaki K., Kusaba M., Ockendon D.J., Nishio T. (1999): Characterization of S tester lines in *Brassica oleracea*: polymorphism of restriction fragment length of SLG homologues and isoelectric points of S-locus glycoproteins. *Theor Appl Genet.* 98: 1329-1334.
- Park J.I., Nou I.S., Lee S.S., Kang K.K., Watanabe M. (2001): Identification of S-genotypes by PCR-RFLP in breeding lines of *Brassica*. *Mol. Cells* 12: 227-232.
- Park J.I., Lee S.S., Watanabe M., Takahata Y., Nou I.S. (2002): Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 121: 192-197.
- Shiba H., Iwano M., Entani T., Ishimoto K., Shimohato H., Che F.-S., Satta Y., Ito A., Takada Y., Watanabe M., Isogai A., Takayama S. (2002): The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in *Brassica* Pollen Is Regulated at the RNA Level. *The Plant Cell* 14: 491-504.
- Schopfer C.R., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. (1999): The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697-1700.
- Sobotka R. (2001): Analýza genu SLG a jeho využití jako selekčního markeru ve šlechtění řepky olejné. Disertační práce. JU ZF v Českých Budějovicích, 2001.
- Stein J., Howlett B., Boyes D. C., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. (1991) Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8816-8820.
- Suzuki G., Kai N., Hirose T., Fukui K., Nishio T., Takayama S., Isogai A., Watanabe M., Hinata K. (1999) Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391-400.
- Takasaki T., Hatakeyama K., Suzuki G., Watanabe M., Isogai A., Hinata K. (2000): The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403: 913-916.
- Watanabe M., Ito A., Takada Y., Ninomiya C., Kakizaki T., Takahata Y., Hatakeyama K., Hinata K., Suzuki G., Takasaki T., Satta Y., Shiba H., Takayama S., Isogai A. (2000): Highly divergent sequence of the pollen self-incompatibility (S) gene in class-I S haplotypes of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *L. FEBS Lett.* 12: 139-144.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1992). *Genetics analysis using RAPD markers. Method Enzymol.* 260: 335-348.
- Žaludová J. (2007): The structure and the function of the S-locus in oilseed rape (*Brassica napus* L.) - Disertační práce, ZF JU České Budějovice, 2007.

## VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

**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., 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., Čurn 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.

**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.

**Kukolíkova B., Zaludova J., Čurn 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., 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.

**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.

**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.

**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.

**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.

**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.

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

**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.

**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.

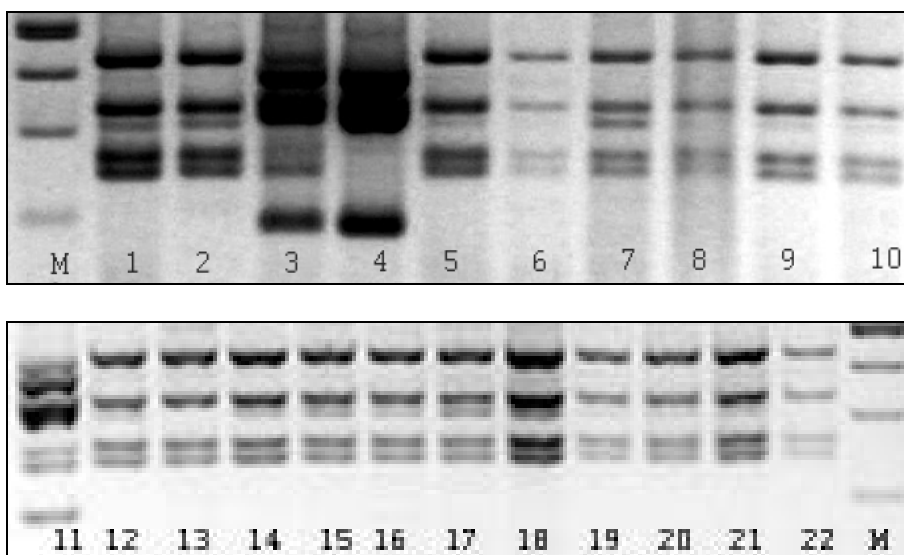
**Sobotka R., Čurn V., Sáková L. (1998):** Metodické aspekty analýzy polymorfismu S-locusu u řepky. Methodological approach to the analysis of S-locus in oil seed rape. - Sborník Jihočeské univerzity, Zem. Fak. v Č. Budějovicích, Ř. Fytotechnická 15: 41-49.

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

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

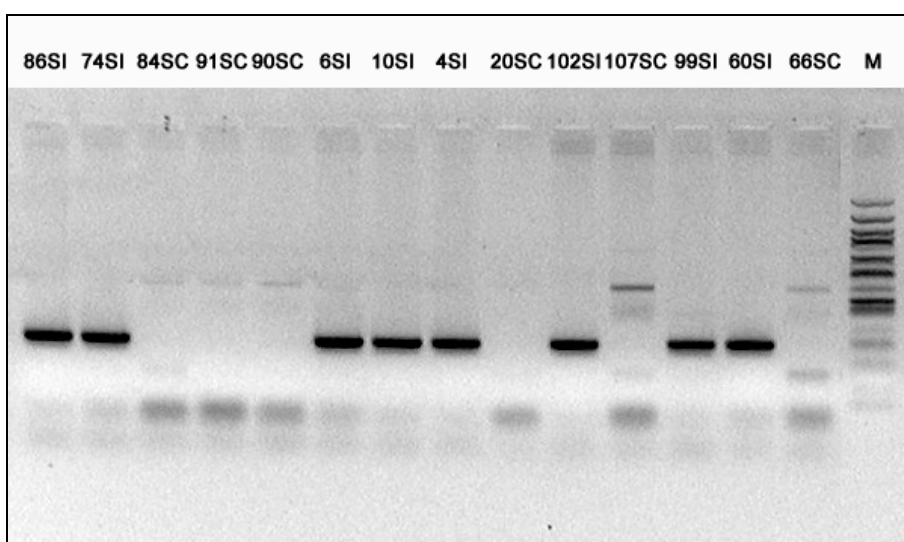
## VII. Příklady výstupů analýzy molekulárních markerů

PCR-RFLP analýza genu *SLG I* u spektra odrůd za použití restriktázy *Mbol*.

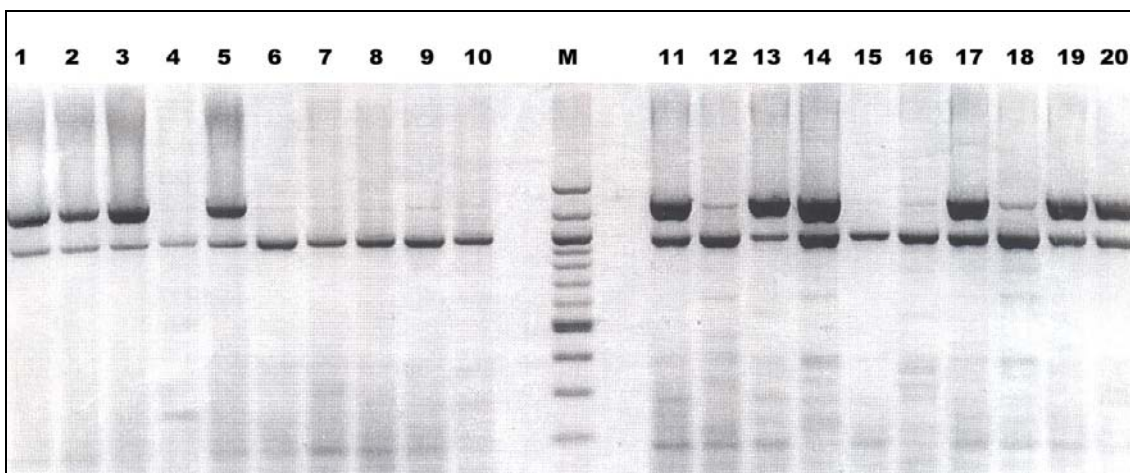


Odrůdy: 1-Orkan, 2-Jesper, 3-Global, 4-Topas, 5-Regent, 6-Ceres, 7-Falcon, 8-Sonata, 9-Arabela, 10-Slapská Stela, 11-Odila, 12-Rasmus, 13-Zorro, 14-Navajo, 15-Lirajet, 16-Mohican, 17-Laser, 18-Capitol, 19-Pilot, 20-Ramiro, 21-Cando, 22-Catonic.

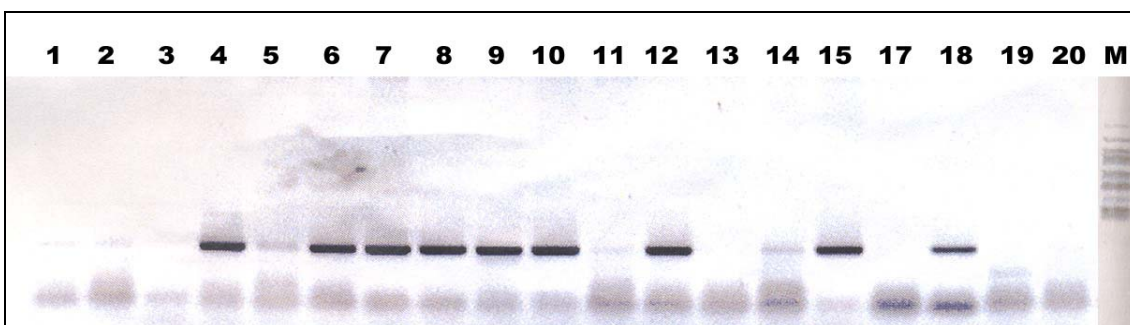
Analýza genu *SCR II* za použití alelicky specifických primerů. Fragment o velikosti 280 bp byl amplifikován u AI rostlin.



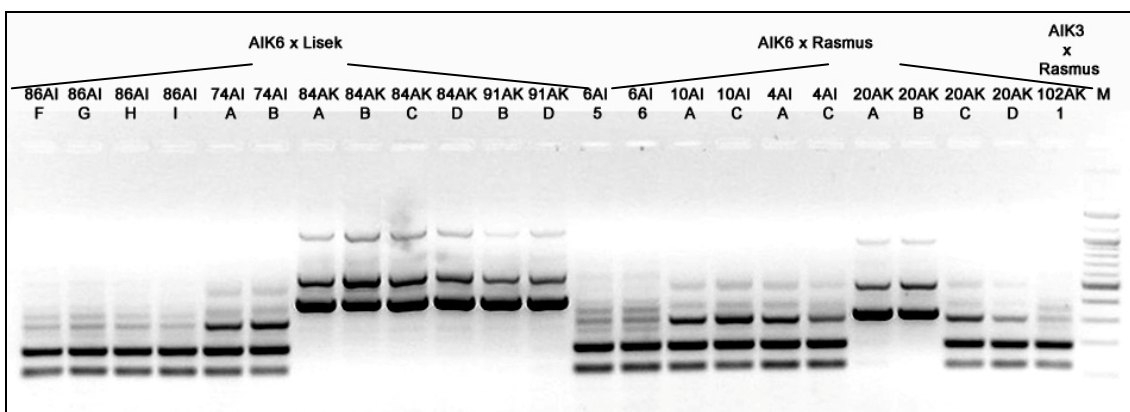
Analýza genu *SLG I*. Horní fragment (velikost 1300 bp) byl amplifikován u AK rostlin (vzorky 1-3, 5, 11, 13-14, 17, 19-20) v segregující DH populaci.



Analýza genu *SCR II*. Fragment o velikosti 280 bp byl amplifikován u AI rostlin (vzorky 4, 6-10, 12, 15, 18) v segregující DH populaci.



PCR-RFLP analýza genu *SCR II*. Amplifikované fragmenty z rostlin z různých křížení byly štěpeny enzymem *Hha I*. U vzorků je doplněn fenotyp – AI/AK.





Název: Čurn V. a kol. (2011): Metodika detekce a molekulární selekce AI linií řepky (*Brassica napus* L.).

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Ing. Božena Kukulíková  
Ing. Lenka Havlíčková  
Ing. Jana Žaludová, 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 28.11.2011 (č.j. 215694/2011-MZE-17011), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

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

ISBN: 978-80-7394-253-3