



Fakulta zemědělská a technologická
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Metodika pro hodnocení genetické variability u brukvovitých zelenin

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910070 - Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám.



Autoři: Ing. Eva Jozová, Ph.D., prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice, 2022

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta zemědělská a technologická

Metodika pro hodnocení genetické variability u brukvovitých zelenin

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1910070 - Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám.

Ing. Eva Jozová, Ph.D.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D

České Budějovice, 2022

Metodika pro hodnocení genetické variability u brukvovitých zelenin

Eva Jozová a kol.

jozovae@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice
2022

www.fzt.jcu.cz

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1910070 - Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám.

Recenzenty metodiky byli:

prof. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani

Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze

MVDr. Kateřina Staňková

ÚKZUZ, Národní referenční laboratoř, Brno

Text: ©2022 Jozová E., Čurn V.

Foto: ©2022 Jozová E.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-959-4

ISBN 978-80-7394-959-4



Obsah

Cíl metodiky.....	5
Vlastní popis metodiky	7
Úvod	7
Izolace DNA z rostlinného materiálu	9
Příprava rostlinného materiálu pro izolaci DNA	9
Izolace DNA pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle, 1991)	9
Chemikálie:	9
Přístroje:	9
Pracovní postup:	10
Měření koncentrace templátové DNA	10
Postup.....	11
Metodika mikrosatelitové analýzy (SSR).....	7
Analýza mikrosatelitů	7
PCR reakce	7
Chemikálie:	7
Přístroje:	7
Příprava 3% agarózového gelu	8
Chemikálie:	9
Přístroje:	9
Postup přípravy:	9
Sekvence specifických primerů pro analýzu mikrosatelitů	10
Metodika fragmentační analýzy.....	11
Fragmentační analýza	11
Příprava primerů pro FA.....	11
Příprava vzorků pro FA	11
Srovnání novosti postupů	18
Popis uplatnění metodiky	18
Ekonomické aspekty	19
Použitá literatura:	20
Publikace předcházející metodice:	21
Příloha	22
Obrazová příloha ukázek některých SSR markerů na agarózovém gelu	22
Obrazová příloha ukázek některých SSR markerů zobrazených pomocí Fragmentační analýzy.....	23
Použité roztoky	25
roztoky pro izolaci DNA	25
pufr pro elektroforézu	26
příprava agarózového gelu	26

Cíl metodiky

Brukvovité zeleniny patří do čeledi *Brassicaceae*, která zahrnuje asi 380 rodů a 3200 druhů. Tato čeleď má významné zastoupení v lidské výživě jak v celosvětovém měřítku, tak i v České republice. Mezi významné zeleniny pěstované v České republice patří např. kapusta, zelí, kedlubny, brokolice, květák apod. a jim příbuzné druhy ředkvičky a ředkve, méně tradiční pak mohou být kadeřávek a tuřín.

Díky velkému množství vyšlechtěných odrůd již není možné rozpoznávání pouze na základě morfologických - fenotypových dat. Cílem této metodiky je popsat takové molekulární analýzy, díky kterým bude šlechtitel, popř. jiný uživatel schopen rozpoznat nejen jednotlivé druhy brukvovitých zelenin a jim podobných druhů, ale zejména rozpoznat různé botanické variety i jednotlivé odrůdy. Díky charakteristickým spektrům jednotlivých odrůd, bude možná přesná identifikace a bude možné odhalit záměny genotypu, pravost odrůd, směsné vzorky, popř. nevyrovnané odrůdy.

Metodika popisuje detailní postupy přípravy rostlinného materiálu, izolaci DNA o dostatečné kvalitě a koncentraci, postupy PCR analýzy, přípravu agarózového gelu, přípravu vzorků pro fragmentační analýzu a přesný popis použitých mikrosatelitových markerů včetně jejich charakteristik.

Vlastní popis metodiky

Úvod

Čeleď brukvovité (*Brassicaceae*), je velmi významná čeleď s více jak 380 rody a přibližně 3200 druhy jednoletých i vytrvalých rostlin. Za genové centrum vzniku těchto kulturních rostlin je považována oblast Středomoří. V České republice se můžeme setkat s přibližně 50 rody a 150 druhy, mezi něž patří nejen druhy využívané pro lidskou výživu, ale také druhy využitelné pro produkci olejů, pícní plodiny či plevelu (<http://www.kvetenacr.cz/celed.asp?IDceled=3>). Mezi nejpěstovanější druhy jak u nás tak i ve světě patří zejména druhy *Brassica*, *Raphanus* a *Sinapis*. K nejvýznamnějším druhům pěstovaných v Evropě se zaměřením na košťálové zeleniny patří druh *B. oleracea*, který zahrnuje plodiny jako zelí, brokolice, květák, růžičková kapusta. Předpokládá se, že většina kulturních forem tohoto druhu pochází z původních divokých forem rostoucích zejména v severním Španělsku, západní Francii a jižní Británii (Cartea et al., 2011). V Asii je pak pěstován zejména druh *B. campestris* (čínské zelí) (Monterio and Lunn, 1999). Rod *Brassica*, a konkrétně pak druh *B. oleracea* zahrnuje mnoho různých variet či morfotypů, které jsou schopné se dobře přizpůsobit mírnému podnebí. Jako zdroj potravy lze u těchto rostlin využít listy, květy, stonky i kořeny, které lze konzumovat jak v syrovém, tak i tepelně upraveném stavu (Dixon, 2006). Rostliny z různých podskupin, ale téhož druhu jsou si mnohdy bližší geneticky než morfologicky, jelikož jsou velmi dobře křížitelné. Díky těmto vlastnostem vznikly v různých částech světa velmi rozmanité morfotypy (Cartea et al., 2011).

Z pohledu šlechtitelů i spotřebitelů se jedná o velmi významné plodiny, jelikož jejich spotřeba v jídelníčku stále stoupá. Zatímco v roce bylo spotřeba zeleniny 65 kg/os, v roce 2020 to bylo již 94 kg/os (www.czso.cz). Díky svému složení je pravidelná konzumace zeleniny spojována s prevencí onemocněním rakoviny. Neodmyslitelná je také role zeleniny jako významného zdroje vitamínů a minerálních látek, které mají významné biologické účinky (Divisi, 2006). Rostoucí ceny v poslední době ovlivňují také zvyšující zájem o pěstování zeleniny v malospotřebitelských podmínkách. Proto je velký zájem o odrůdy, které mají delší vegetační dobu, jsou preferované zeleniny nejen s menšími rozměry plodů, ale i samotných rostlin.

V posledních letech se objevuje několik nových trendů v pěstování zeleniny jako je např. pěstování u nás doposud minoritních zelenin kadeřávku a tuřínu. Příprava těchto nových odrůd může klasickým šlechtěním trvat 6-8 let. Proto se jako doplněk ke klasickému šlechtění používají i metody moderní, jako jsou biotechnologické metody, či využívání různých molekulárních selekčních markerů. Využití těchto metod dokáže napomoci k výraznému zkrácení šlechtitelského procesu při získávání nových odrůd s unikátními znaky.

Pro identifikaci jednotlivých variet a odrůd brukvovitých zelenin a zjištění jejich genetické podobnosti či odlišnosti byly využity mikrosatelitové molekulární markery,

které jsou svým charakterem velmi vhodné pro tyto analýzy a na základě předchozích výzkumů jsou prokazatelně vysoce informativní. Jejich výhodou je opakovatelnost a přesnost (Jozová, 2014).

K ověření vhodnosti využití této metodiky bylo využito sortimentu 149 různých odrůd brukvovité zeleniny poskytnuté firmou MORAVOSEED CZ a.s. Konkrétně bylo testováno: 120 odrůd druhu *B. oleracea* náležejících k varietám *capitata* (11 odrůd), *botrytis italica* (2 odrůdy), *botrytis* (3 odrůdy), *capitata* f. *alba* (43 odrůd), *capitata* f. *rubra* (5 odrůd), *italica* (4 odrůdy), *sabellica* (11 odrůd), *sabauda* (12 odrůd), *gemmifera* (4 odrůdy), *gonglyodes* (24 odrůd), *acephala* (1 odrůda), 8 odrůd druhu *B. rapa* a 21 odrůd druhu *Raphanus sativus*.

Izolace DNA z rostlinného materiálu

Příprava rostlinného materiálu pro izolaci DNA

Pro každou odrůdu či šlechtitelský materiál je třeba vyset do substrátu 36 semen. Rostliny se nechají vyrůst do fáze plně vyvinutých děložních listů (cca 1 týden). Následně probíhá sterilní odběr materiálu do papírových sáčků po jednotlivých odrůdách. Materiál se nechá šetrně vysušit v silica gelu (cca 1 týden). Po důkladném vysušení se materiál převede do 2 ml sterilních mikrocentrifugačních zkumavek. Přidají se 2 skleněné kuličky a materiál se homogenizuje pomocí homogenizátoru (např. Beat Ruptor 96) po dobu 30 sec a při maximální frekvenci. Takto zhomogenizovaný materiál je možné skladovat v mrazáku při -20°C až do doby samotné izolace DNA.

Pokud není k dispozici robotický homogenizátor, je možná ruční homogenizace. Záleží na možnostech a zvyklostech laboratoře.

Izolace DNA pomocí modifikované CTAB-PVP metody (Doyle, 1991)

Tato izolační metoda je vhodná pro izolaci DNA z většího množství rostlinného materiálu. Získaná DNA je velmi kvalitní a čistá, při dlouhodobém skladování nedegraduje. Ověřená doba použití DNA je až 4 roky. Takto čistá DNA je velmi vhodná při využití metod jako je např. AFLP, SSR a ISSR.

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

Chemikálie:

- ethanol (96%, 70%)
- 2x CTAB-PVP extrakční pufr (2% CTAB, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1,4mM NaCl, 1% PVP-40000)
- 2-merkapt ethanol
- 5% CTAB
- chloroform : IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA)
- isopropanol

Přístroje:

- centrifuga s možností chlazení, sada automatických pipet, homogenizátor, vortex, třepací termoblok, termostat, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Pracovní postup:

- ke zhomogenizovanému materiálu přidat 1000 μ l extrakčního pufru (990 μ l 2x CTAB-PVP +10 μ l β -merkaptoethanol), materiál promíchat s puforem
- nechat 45-60 min inkubovat při 65°C ve vodní lázni, promíchat každých 15 minut
- centrifugovat na 14 000 rpm (maximum) 10 minut – v případě velkého znečištění je možné tento krok prodloužit na 15 minut
- převést supernatant do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 750 μ l chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 min nechat protřepávat
- centrifugovat 5 min na maximum
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 1/5 (cca 200 μ l) 5% CTAB a promíchat
- přidat 750 μ l chloroformu : IAA (24 : 1) a 10 minut protřepávat
- centrifugovat 5 min na maximum
- přepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 2/3 izopropanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20°C přes noc
- centrifugovat 5 minut na maximum při 4°C
- odstranit supernatant
- přidat 300 μ l dH₂O a nechat 30-60 minut rozpouštět na třepačce při 37°C
- přidat 2 objemy (600 μ l) 100% studeného ethanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20°C 12 hod (přes noc)
- centrifugovat 10 minut na maximum při 4°C
- odstranit supernatant
- přidat 1000 μ l 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- odstranit supernatant
- přidat 1000 μ l 70% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na maximum
- přebytečnou tekutinu odpipetovat a nechat sušit při 37°C po dobu 15-20 minut (nenechat pelet přeschnout, špatně se rozpouští)
- přidat 100 - 200 μ l TE pufru a cca 40 minut nechat rozpouštět při 37°C
- skladovat v -20°C

Měření koncentrace templátové DNA

Analýza mikrosatelitů je velmi citlivá na čistou DNA se stejnou koncentrací u všech používaných vzorků. Proto je třeba určit koncentraci DNA vhodnou metodou. Roztok nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleových kyselin, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů.

Pro potřeby měření koncentrace byl použit spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu). Sledovány byly zejména parametry: koncentrace DNA vyjádřená v ng/ μ l, poměr 260/280, který by měl být v ideálním případě v rozmezí 1,8-2,0 a poměr 260/230, který by měl mít hodnoty od 2,0 do 2,2.

Postup

- napipetovat 1,5 µl slepého vzorku dle pufru, ve kterém je DNA rozpuštěna (1x TE pufr, milliQ voda nebo chelex)
- postupně nanášet 1,5 µl každého vyizolovaného vzorku (před nanášením je potřeba lehce promíchat, před samotným měřením v programu vzorek popsat)
- výstupem je tabulka dat (koncentrací DNA a parametrů čistoty) ve formátu pdf nebo xls

Pokud DNA vzorku nedosahuje potřebných hodnot, je třeba vzorky přečistit, např. pomocí octanu sodného.

Metodika mikrosatelitové analýzy (SSR)

Nejvhodnější metodou pro identifikaci odrůd je mikrosatelitová analýza (SSR). Mikrosatelity jsou krátké tandemově se opakující repetice o délce 1-6 párů bází. Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50-ti kopiích (Ashkenazi et al., 2001). Mikrosatelity mohou být nalezeny jak v kódujících, tak i nekódujících úsecích genomu (Varshney et al., 2005). Mikrosatelity se řídí jednoduchou mendelistickou dědičností, proto mohou být při použití pro velmi příbuzné druhy konzervativní, ovšem pro odlišení odrůd se ukázaly jako vhodný pomocník (Pilinsky et al., 2011). Počet opakování jednotky v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu. Délku alely lze zjistit po elektroforetické/fragmentační analýze PCR produktů daného lokusu díky použitím primerů specifických pro příslušný lokus (Čurn et al., 2012).

Analýza mikrosatelitů

Analýza mikrosatelitů je často využívanou metodou pro identifikaci odrůd. Výhodou této analýzy je poměrně velké množství známých mikrosatelitních lokusů a jejich výskyt v genomu, kodominantní dědičnost, dostupné techniky analýzy mikrosatelitních (SSR) markerů a jejich opakovatelnost (Seyfert et al., 2008). Pro potřeby hodnocení variability jak na druhové tak i odrůdové úrovni byly optimalizovány postupy pro známé mikrosatelitové primery, ovšem prvotně využívané pouze pro hodnocení mezidruhové variability (Louarn et al., 2007, Cui et al., 2008). Konkrétně se jedná o tyto primery: D12, P17, P7, P35, BoREM1b, BoDCTD1, BoIAB19TF, BoPC34, P381, P54-1, D3, P9, P592.

PCR reakce

Chemikálie:

- PPP master mix (Top Bio) nebo OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB)
- templátová DNA (konc. 200 ng/μl)
- mikrosatelitové primery (konc. 10pmol)
- PCR H₂O

Přístroje:

- PCR thermocycler, vortex, mini centrifuga, sada automatických pipet

Amplifikace probíhala na thermocycleru Biometra TProfessional Gradient (Analytik Jena, Německo) v těchto následujících teplotních profilech:

cyklus 1 (Louarn et al., 2007):

- počáteční denaturace	5 min	94°C
- 31 cyklů	1 min	95°C
	1 min	52/59°C
	1 min	68°C/72°C*
- konečná elongace	5 min	68°C/72°C*
- stop	∞	4°C

cyklus 2 (Cui et al., 2008):

- počáteční denaturace	5 min	94°C
- 35 cyklů	45 sec	94°C
	45 sec	52/59°C
	45 sec	68°C/72°C*
- konečná elongace	5 min	68°C/72°C*
- stop	∞	4°C

složení PCR reakce:

5 µl master mixu NEB/TopBio**
0,2 µl F primeru (10 pmol)
0,2 µl R primeru (10 pmol)
0,1 µl BSA
4 µl PCR H₂O
0,5 µl DNA (200 ng/ µl)
celkový objem reakce 10 µl

* teplota 68°C platí při použití master mixu OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB) / teplota 72°C platí při použití master mixu PPP Master mix (TopBio)

** NEB – master mix OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB) / TopBio – master mix PPP Master mix (TopBio)

PCR produkty jsou rozdělovány na 3% agarozovém gelu v 1x TBE pufru. Jako velikostní marker je používán 100 DNA bp ladder (NEB). Fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromid pod UV světlem. Zaznamenání a vizualizaci produktů probíhá na přístroji INGENIUS3 (Syngene) a software GeneSys. Vizualizace je možné provádět i na jiném zařízení podle vybavenosti laboratoře.

Příprava 3% agarozového gelu

Separace na agarózové gelu je základní metoda používaná k rozdělení makromolekul. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. PCR produkty o stejné délce postupují stejně rychle a tím dochází k vytvoření fragmentů o různé délce. DNA je na gelu vizualizována pomocí interkalačního barviva ethidium

bromid, které se váže na dvoušroubovici DNA. Fragmenty jsou viditelné až pod UV světlem. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je potenciální karcinogen, je třeba pracovat velmi pečlivě a opatrně. Odpad se ukládá ve zvláštní nádobě a likviduje se jako nebezpečný.

Pro přípravu agarózového gelu byla použita agaróza (Agarosa SERVA Tablets 0,5 g). Jelikož 3% agarózový gel je náročný na přípravu, je vhodné použít agarózu v tabletách pro jejíž snazší přípravu. Gel pro účely mikrosatelitové analýzy je připravován v objemu 100 nebo 200 ml, tzn. 6 agarózových tablet do 100 ml 1xTBE a 12 agarózových tablet do 200 ml 1xTBE (viz. tabulka 1).

Tabulka 1

objem gelu	množství tablet agarózy (ks)	objem EtBr	napětí	čas
100 ml	6	5 µl	120 V	1 hod
200 ml	12	10 µl	150 V	1 hod 30 min

Chemikálie:

- Agarosa SERVA Tablets 0,5g
- 1x TBE
- roztok ethidium bromidu
- 100 bp DNA ladder (NEB)
- PCR produkt

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem
- vyhodnocovací zařízení s UV

Postup přípravy:

- Agarózové tablety rozpustit v požadovaném množství v 1xTBE v dostatečně velké Erlenmayerově baňce. Tablety se rozpouštějí cca 5 min.
- Vložit do mikrovlnné trouby a výkon nastavit na cca 500 W. Výkon nesmí být maximální, tekutina v baňce velmi rychle vzkypí a mohlo by dojít k přelití. Roztok agarózy je třeba velmi často kontrolovat a promíchat.
- Po dokonalém rozpuštění je třeba roztok agarózy vychladit pod tekoucí vodou (cca na 60 °C). Přidá se odpovídající množství ethidium bromidu a důkladně promíchá. Agaróza se plynulým pohybem nalije do předem připravené nalévací vany. Odstraní se nežádoucí bubliny, vloží se hřebínek a nechá se přibližně 30 zatuhnout.
- Po zatuhnutí se vyjme hřebínek a gel se umístí do elektroforetické vany tak, aby byl zcela potopený v 1xTBE pufru.
- Celý objem PCR reakce (10 µl) se nanáší do jamek. Do první a poslední jamky se nanese 100 bp ladder.
- Separace fragmentů probíhá za podmínek uvedených v tabulce 2.

Sekvence specifických primerů pro analýzu mikrosatelitů

Tabulka 2

Primer	sekvence	annealing	MM	amplifikace			polymorfismus			cyklus
				B.ol	B.ra	R.sat	druhový	variety	odrůdy	
BoREM1b (Louarn et al., 2007)	F: TCC GAA AGT GGG GAA AGG R: TGT GTC AGA AAG CGA GAA GG	59°C	NEB	A	A	N	A	A	A	1
BoDCTD1 (Louarn et al., 2007)	F: AGA AAG CAG ACG GGA ATG G R: TGG TTA AAG CGA AAG TGT GC	52°C	NEB	A	N	N	A	A	A	1
BoIAB19TF (Louarn et al., 2007)	F: AAG CCA CCT CAC CTT AGC C R: GAA ATC CCA GAG ACT GAA AAC C	59°C	NEB	A	N	N	A	A	A	1
BoPC34 (Louarn et al., 2007)	F: TCC AAG ACC GTA GAG GAG GA R: AAG CCA ACA AAC TTC AAC AAC A	59°C	NEB	A	A	A	A	A	A	1
P381 (Cui et al., 2008)	F: TAG TCG GTC GTC AGA ACA R: ATG TGG CAT AAA ACT CGA	52°C	NEB	A	A	A	A	?	?	1
P54-1 (Cui et al., 2008)	F: AAA TGT GAG AGA GAG AGA GAG AG R: TAA TAG AAC ACG TTG GAG CTT A	52°C	TOP	A	A	A	A	A	A	1
P592 (Cui et al., 2008)	F: GAT CAG AGA GAG AGA GAG AGA R: GAT AAC GAT GGT GCT CTA AGT	52°C	TOP	A	N	N	A	A	?	2
D3 (Cui et al., 2008)	F: GGA GCC AGG AGA GAA GAA GG R: CCC AAA ACT TCC AAG AAA AGC	52°C	NEB	A	A	N	A	A	?	1
D12 (Cui et al., 2008)	F: ATG TCC GGA TAA CCG AAT CC R: GAA GCT TTT CAA TTT TTA AGT T	52°C	NEB	A	A	N	A	A	?	1
P17 (Cui et al., 2008)	F: CCC CTC TTT GAT TCT CCT CCG A R: CGT GGT ATG TTG GTA TTG GGT CGT	52°C	TOP	A	A	A	A	?	?	1
P7 (Cui et al., 2008)	F: TCC CCT CTT TCC TCT CTC TCT AGG R: AAA CCT CTC AAA AAC CCC TAA ACG	52°C	NEB	A	N	A	A	?	?	1
P35 (Cui et al., 2008)	F: TCC CAC GCC TTC TAG CCT TC R: ACC GGA GCT TTT CTG TTG CC	52°C	NEB	A	N	N	A	A	?	1
P9 (Cui et al., 2008)	F: AGG ACA CCA GGC ACC ATA TA R: CAT TGT TGT CTT GGG AGA GC	52°C	NEB	A	A	N	A	A	?	1

LEGENDA:

A – ANO

N – NE

? – na základě gelové elektroforézy není možné určit

MM – MASTER MIX

Hodnocení mikrosatelitů pomocí agarózového gelu je vhodné pro identifikaci jednotlivých druhů. Na agarózovém gelu není jednoznačně odlišit odrůdy. Pro identifikaci na úrovni variet a odrůd je potřeba využít metodiku fragmentační analýzy. Popis je uveden v postupu na dalších stránkách metodiky.

Metodika fragmentační analýzy

Jelikož u některých SSR primerů jsou rozdíly v PCR produktech v případě porovnání jednotlivých odrůd jen v jednotkách bází, je třeba vyhodnocovat výsledky sofistikovanější metodou, jakou je fragmentační analýza.

Amplifikované fragmenty jsou značeny fluorescenční značkou, která je navázána na specifické primery. Dochází k naznačení vždy jednoho primeru (forward). Výstupy jsou ve formě píků. Jeden pík odpovídá jedné alele.

Fragmentační analýza

Příprava primerů pro FA

Pro usnadnění a zlevnění analýzy lze dohromady využít až 4 různé barvy značení, tzn. že výstupem je graf s různými barvami píků. Komplikací může být optimalizace všech kombinací tak, aby u všech píků byla stejná intenzita záření, která je vyjádřena výškou píků srovnatelná. Velikost jednotlivých píků je odečítána podle velikostního standardu. Další možností úspory při fragmentační analýze, která byla využita právě pro tyto účely, je využití univerzálního značeného primeru, konkrétně byly použity značené primery Ba02 nebo Ba03 (Enkerli et al., 2001), které jsou standardně využívány pro analýzu SSR u entomopatogenních hub. V tomto případě je používán pouze jako značený marker a neovlivňuje vlastní hodnocení. Princip nasedání primerů je zobrazen na obrázku 1.

Příprava vzorků pro FA

Složení PCR reakce pro FA

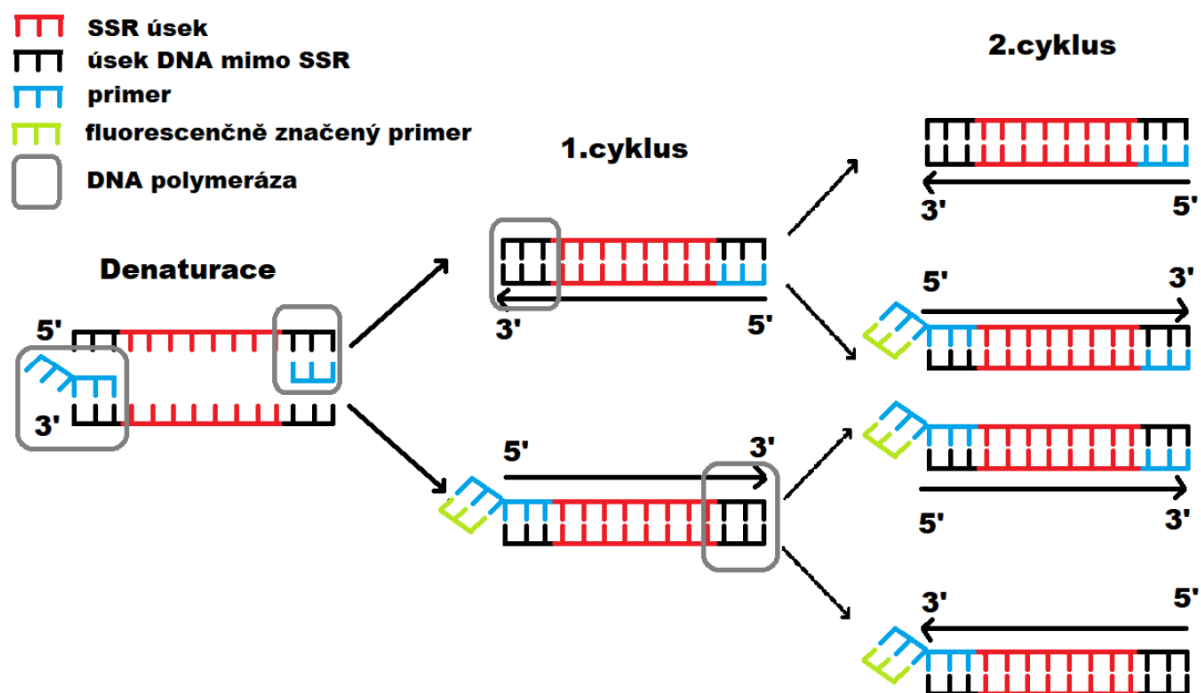
- 5 µl Master Mix
- 3,75 µl PCR vody
- 0,1 µl každého primeru (10 pmol)
- 0,05 µl BSA
- 1 µl DNA (5-10 ng/µl)

Příprava vzorku pro FA:

- 10 µl Hi-Di Formamide
 - 0,5 µl Size Standard GeneScan 500 LIZ
 - 1 µl PCR reakce
-
- takto připravený vzorek inkubovat při 94 °C po dobu 5 minut
 - ihned zchladit po dobu minimálně 2 minut

Fragmentační analýza probíhá na sekvenátoru ABI3500 (Applied Biosystems). Vyhodnocování fragmentů probíhá v programu GeneMapper (Applied Biosystems).

Sekvence použitých primerů pro FA a jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 1 Schéma nasedání fluorescenčně značeného primeru v PCR reakci

Tabulka 3 Popis specifických primerů a jejich vlastností při použití pro fragmentační analýzu

Primer	sekvence	annealing	MM	amplifikace			polymorfismus			cyklus
				B.ol	B.ra	R.sat	druhový	variety	odrůdy	
BoREM1b (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CTC CGA AAG TGG GGA AAG G R: TGT GTC AGA AAG CGA GAA GG	59°C	Top	A	A	N	A	A	A	1
BoDCTD1 (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CAG AAA GCA GAC GGG AAT GG R: TGG TTA AAG CGA AAG TGT GC	52°C	Top	A	N	N	A	A	A	1
BoIAB19TF (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CAA GCC ACC TCA CCT TAG CC R: GAA ATC CCA GAG ACT GAA AAC C	59°C	Top	A	N	N	A	A	A	1
BoPC34 (Louarn et al., 2007)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CTC CAA GAC CGT AGA GGA GGA R: AAG CCA ACA AAC TTC AAC AAC A	59°C	Top	A	A	A	A	A	A	1
P381 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA CTA GTC GGT CGT CAG AAC A R: ATG TGG CAT AAA ACT CGA	52°C	Top	A	A	A	A	A	A	1
P54-1 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C AAA TGT GAG AGA GAG AGA GAG AG R: TAA TAG AAC ACG TTG GAG CTT A	52°C	Top	A	A	A	A	A	A	1
P592 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C GAT CAG AGA GAG AGA GAG AGA R: GAT AAC GAT GGT GCT CTA AGT	52°C	Top	A	N	N	A	N	N	2

Primer	sekvence	annealing	MM	amplifikace			polymorfismus			cyklus
				B.ol	B.ra	R.sat	druhový	variety	odrůdy	
D3 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C GGA GCC AGG AGA GAA GAA GG R: CCC AAA ACT TCC AAG AAA AGC	52°C	Top	A	A	A	A	N	N	1
D12 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C ATG TCC GGA TAA CCG AAT CC R: GAA GCT TTT CAA TTT TTA AGT T	52°C	Top	A	A	N	A	A	A	1
P17 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba03): GCATAGATATGTCTCGCACC F: GCATAGATATGTCTCGCACC CCC CTC TTT GAT TCT CCT CCG A R: CGT GGT ATG TTG GTA TTG GGT CGT	52°C	Top	A	A	A	A	A	A	1
P7 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C TCC CCT CTT TCC TCT CTC TCT AGG R: AAA CCT CTC AAA AAC CCC TAA ACG	52°C	Top	A	N	A	A	A	A	1
P35 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C TCC CAC GCC TTC TAG CCT TC R: ACC GGA GCT TTT CTG TTG CC	52°C	Top	A	N	N	A	A	A	1
P9 (Cui et al., 2008)	Znač (Ba02): AAC GCT ATG CCT TGA CGA C F: AAC GCT ATG CCT TGA CGA C AGG ACA CCA GGC ACC ATA TA R: CAT TGT TGT CTT GGG AGA GC	52°C	Top	A	A	N	A	A	A	1

Vzhledem k tomu, že bylo hodnoceno několik druhů a jejich variet, došlo u některých mikrosatelitů k nasedání primerů na více místech v genomu. Konkrétně se jedná o tyto markery: **P35**, **BoREM1b**, **BoDCTD1**, **BoIAB19TF**, **P54-1**, **D3** a **P9**. Přesné charakteristiky včetně amplifikace pro konkrétní druhy a velikosti alel jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Zobrazení amplifikace alel pro jednotlivé druhy

Marker	D12								
Alela	193	253	267	276	281	322	340	346	357
B. ol									
B. rapa									
R. sat									

Marker	P17					
Alela	146	147	149	150	151	153
B. ol						
B. rapa						
R. sat						

Marker	P7					
Alela	146	148	158	162	164	168
B. ol						
B. rapa						
R. sat						

Marker	P35					
Alela	143	145	152	154	155	157
B. ol						
B. rapa						
R. sat						

Marker	BoREM1b A		B	C		D
Alela	175	178	182	185	187	201
B. ol						
B. rapa						
R. sat						

Marker	BoDCDT1 A						BoDCDT1 B					
Alela	153	155	160	164	165	166	172	173	174	175	176	177
B. ol												
B. rapa												
R. sat												

Marker	BoDCDT1 C			
Alela	180	181	183	184
B. ol				
B. rapa				
R. sat				

Marker	BoPC34					
Alela	143	144	151	154	156	157
B. ol						
B. rapa						
R. sat						

Marker	P381
Alela	229
B. ol	
B. rapa	
R. sat	

Marker	P54-1 A										P54-1 B		
Alela	91	92	94	95	96	97	98	99	101		193	201	209
B. ol													
B. rapa													
R. sat													

Marker	D3A	D3B							D3C			
Alela	188	189	192	194	196	197	198		204	207	209	218
B. ol												
B. rapa												
R. sat												

Marker	P9A				P9B		P9C	P9D	
Alela	113	118	119	121	130	136	200	230	236
B. ol									
B. rapa									
R. sat									

Marker	B3
Alela	158
B. ol	
B. rapa	
R. sat	

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku “Metodika pro hodnocení genetické variability u brukvovitých zelenin” lze hodnotit jako novou. V současnosti není k dispozici ucelená metodika pro hodnocení genetické variability na úrovni variet ani odrůd se zaměřením na odrůdy brukvovitých zelenin. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích, které se zabývají problematikou molekulárních markerů. 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, 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. Výhodou je možnost výběru vhodného postupu dle potřeb šlechtitelů a podle vybavenosti laboratoře. Tyto molekulární markery jsou optimalizovány tak, aby bylo možné dostatečně přesně určit polymorfismus na úrovni variet a zejména odrůd, popsat a identifikovat odrůdy na molekulární úrovni a určit i genetickou vzdálenost analyzovaných odrůd, resp. popsat míru genetické variability u souboru analyzovaných odrůd.

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro genotypizaci odrůd brukvovitých zelenin pomocí SSR markerů v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru rostlinného materiálu, izolaci DNA, PCR až po popis možných metod pro vyhodnocení získaných dat, které jsou standardně používané na pracovišti Katedry genetiky a biotechnologií, FZT JU.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro rychlou a spolehlivou detekci k účelům odlišení odrůd brukvovitých zelenin. Optimalizována byla metoda SSR, která je založena na amplifikaci úseků obsahující mikrosatelitové alely o různé délce.

Ačkoliv molekulární markery nejsou dosud standardně využívány pro potřeby odlišení odrůd, mohou být vhodným doplňkem při hodnocení morfologických dat. Výhodou těchto analýz je zejména rychlost a možnost detekovat polymorfismus již v raném stádiu rostliny nedestruktivní metodou a není třeba čekat do doby, kdy jsou dobře hodnotitelné morfologické znaky. Analýzy také nejsou ovlivňovány faktory vnitřního a vnějšího prostředí.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště a šlechtitelské stanice, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy molekulárních markerů. Na základě této metodiky lze identifikovat odrůdy, hodnotit čistotu a odrůdovou pravost v průběhu šlechtění a množení. Další uplatnění metody je při hodnocení genetické odlišnosti odrůd a výběru vhodných rodičovských komponent pro další šlechtění. Metodika bude uplatněna prostřednictvím šlechtitelské firmy Moravoseed CZ, a.s. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Molekulární markery popisované v této metodice mají značný ekonomický význam pro semenářské či obchodní firmy a šlechtitelská pracoviště (hodnocení pravosti a čistoty osiva, odrůdové deklarace produktu – semen, selekce genotypů při šlechtění). Vzhledem k tomu, že u většiny ekonomicky významných plodin dochází k zužování genetické diverzity, mohou právě molekulární markery velice rychle pomoci s genetickým popisem a identifikací odrůd. Výhodou těchto markerů je, že lze analyzovat mladé rostliny nedestruktivním způsobem a po rychlé analýze ponechat pouze rostliny žádaného genotypu, čímž se významně sníží náklady na dopěstování a doba šlechtění jedné odrůdy se může výrazně zkrátit. Důležitá je i rychlost analýzy, kdy pro detailní morfologickou analýzu je zapotřebí celá doba vegetace, v případě molekulární analýzy jsou pak výsledky k dispozici i v řádu hodin.

Pro běžně vybavenou molekulárně-biologickou laboratoř jsou náklady spojené s analýzou SSR markerů minimální, pokud je ovšem dostačující zobrazení výsledků pouze na agarózovém gelu. Stačí základní přístrojové vybavení (termocycler, elektroforetická vana, váhy, centrifuga, pipety). Cena izolačního kitu se pohybuje v hodnotách cca 15 tis – 25 tis. Kč pro 250 vzorků, tzn. 60-100 Kč na vzorek. Tento kit lze zaměnit za mnohem levnější alternativu izolace pomocí CTAB-PVP, kde částka dosahuje přibližně třetinových nákladů. Tato metoda je sice pracnější a zdlouhavější, ale vyizolovaná DNA je velmi kvalitní o vysoké koncentraci a oproti DNA vyizolované pomocí kitu je možné DNA použít pro analýzy i po několika letech vhodného skladování. Další položkou je syntéza specifických primerů, kde se cena jednoho primeru pohybuje kolem 160 Kč. Ostatní položky nevyžadují nutnost specifikace a jsou používány dle zvyklostí laboratoře.

Molekulární marker SSR pro fragmentační analýzu vyžaduje výraznější náklady na pořízení genetického analyzátoru, který se pohybuje řádově v jednotkách milionů. Další náklady jsou spojené se syntézou značených primerů. Kdy cena jednoho značeného primeru se pohybuje od 2 tis. Kč dle použité fluorescenční barvy. Tyto náklady jsou ale díky této metodice výrazně sníženy, jelikož pro analýzy jsou použity pouze 2 fluorescenčně značené primery na 13 klasických primerových párů, tzn. úsporu v řádu desítek tisíc korun. Náklady na fragmentační analýzu lze ale snížit několika způsoby. Genetický analyzátor není nezbytností, jelikož analýzu si lze objednat formou služby, kde cena jedné analýzy vychází na 80 Kč. I tyto náklady lze eliminovat a to více způsoby. Např. lze použít 4 značené forward primery s odlišným fluorescenčním značením, které budou analyzovány současně v jednom běhu fragmentační analýzy a tím se náklady na službu sníží čtyřnásobně. Tato metoda je ovšem náročnější na optimalizaci. Vyšší náklady na analýzu jsou ovšem vyváženy velmi přesnými výsledky s vysokou vypovídající schopností.

Softwarové vybavení pro základní vyhodnocení genetické vzdálenosti nevyžadují žádné specifikace. Dostatečný je klasický tabulkový editor a program vhodný pro výpočet clusterové analýzy.

Použitá literatura:

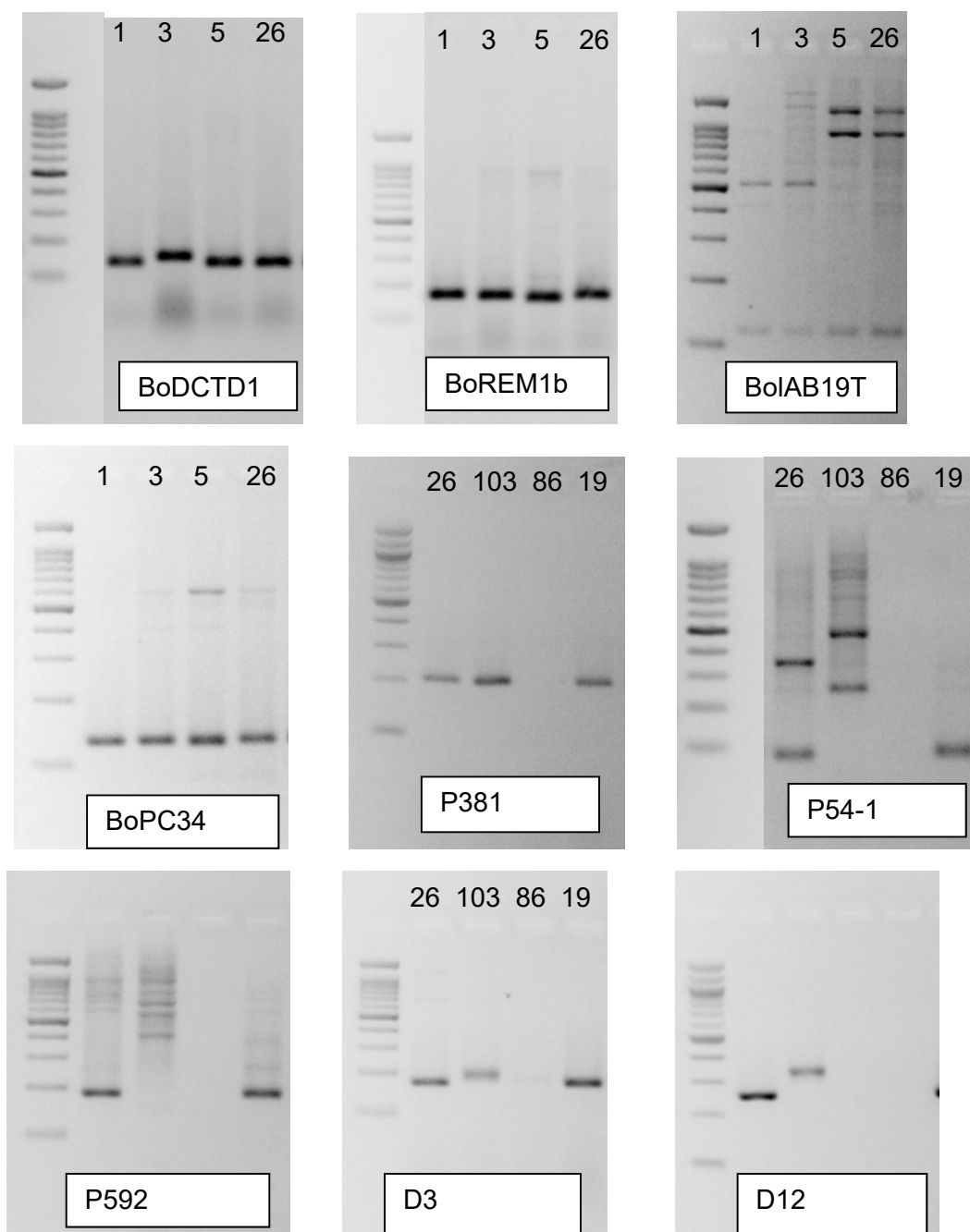
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hiller, J., Veilleux, E., 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses, *Genome*, 44: 50-62
- Cartera, M.E., Lema, M., Francisco M., 2011. Basic information on Vegetable Brassica Crops, 1 st Edition, CRC Press, p 33, ISBN 9780429065897
- Cui, X., Dong, Y., Hou, X., Cheng, Y., Zhang, J., Jin, M. 2008. Development and Characterization of Microsatellite Markers in *Brassica rapa ssp. chinensis* and Transferability Among Related Species. *Agriculture Sciences in China*, 7(1): 19-31
- Čurn, V., Kukulíková, B., Havlíčková, L., Žaludová, J., 2012. Metodika detekce a molekulární selekce autoinkompatibilních linií řepky (*Brassica napus* L.), Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum JU ZF České Budějovice.
- DIVISI, D. et al. Diet and cancer. *Acta Biomedica*, 2006, vol. 77, pp. 118-123.
- DIXON, G.R. Vegetable brassicas and related crucifers. 2007. Wallingford: CABI, 327 str.
- Doyle J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg
- Enkerli, J., Widmer, F., Gessler, C., Keller, S. (2001): Strain-specific microsatellites markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Mycol Res* 105: 1079-1087.
- <https://www.czso.cz/documents/10180/143060175/27013921q6.pdf/e729f9c0-a27b-4b88-9177-b2dfa001f296?version=1.1> [online 22.7.2022]
- Jozová, E., Čurn, V., 2014. Multiplexová analýza mikrosatelitů u řepky pomocí modifikovaných fluorescenčně značených primerů. *Úroda, vědecká příloha*, 2014: (12): 191-194.
- Louarn, S., Torp, A.M., Holme, I.B., Andersen, S.B, Jensen, B.D., 2007. Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1717-1725
- Monterio A., Lunn, T. (1999). Trends and perspectives of vegetable brassica breeding world-wide. WCHR – World Conference on Horticultural Research, 1 September 1999, Rome Italy, 10.17660/ActaHortic.1999.495.12
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Pilinsky, S., Szoke, A., Kiss, E., Heszky, L., Falusi, J., 2011. Characterization of oilseed genotypes using microsatellite based DNA barcode, 13 th International Rapeseed Congress, Prague, July 05-09, 2011, 250.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications, *Trends Biotech*, 23: 48-55

Publikace předcházející metodice:

- Hejna O., Havlickova L., He Z., Bancroft I., Curn V. (2019): Analysing the genetic architecture of clubroot resistance variation in *Brassica napus* by associative transcriptomics. *Molecular Breeding*, 39, 112.
- Jozová, E., Čurn, V., 2020. Hodnocení genetické diverzity genetických zdrojů hořčice pomocí mikrosatelitových markerů. *Úroda – vědecká příloha*, 2020: (12): 55-61
- Jozová E., Rychlá A., Čurn V. (2021). Mikrosatelitové markery jako účinný nástroj pro hodnocení čistoty osiva. *Seed and Seedlings XV. Sborník referátů*. p: 31-37.

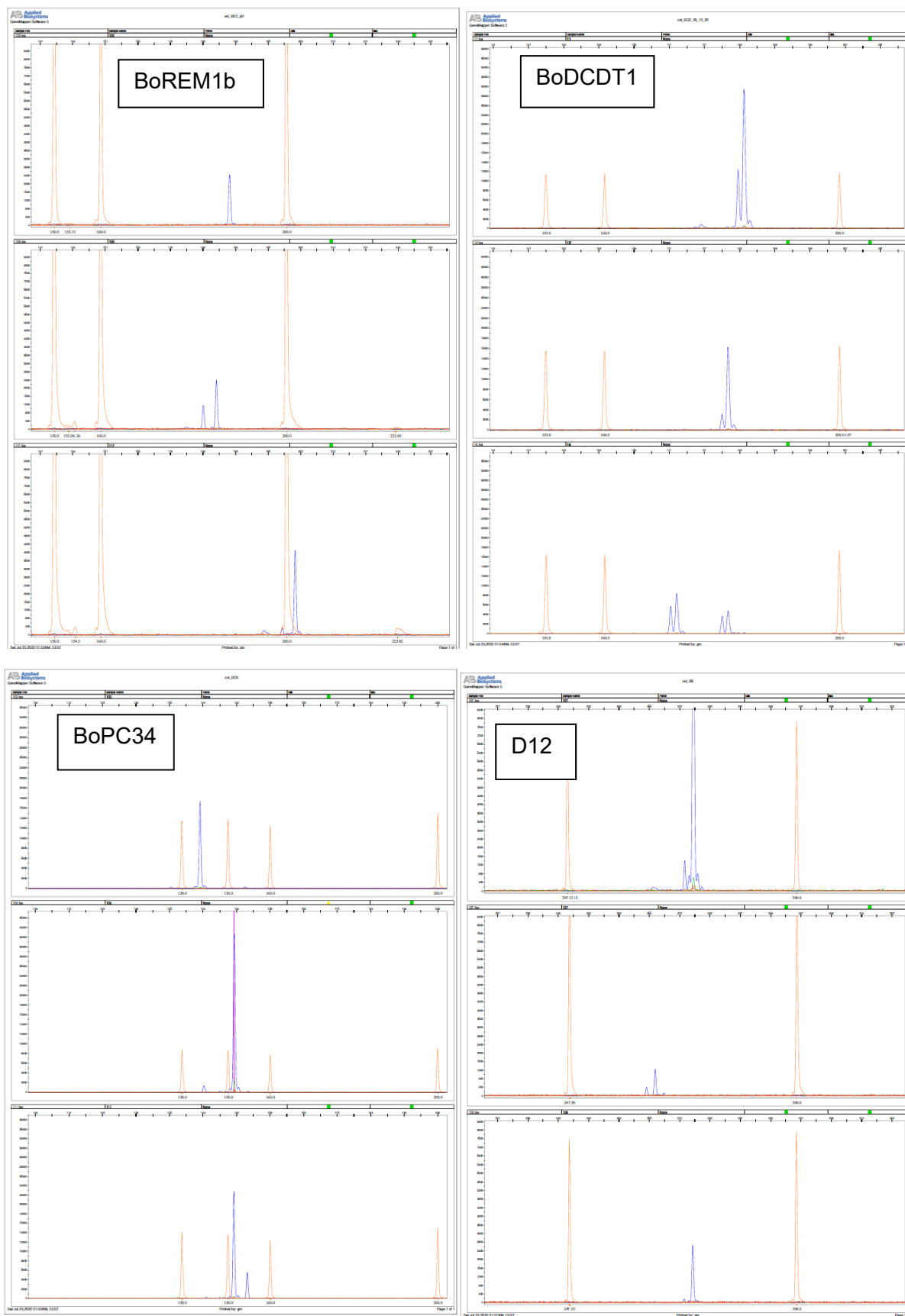
Příloha

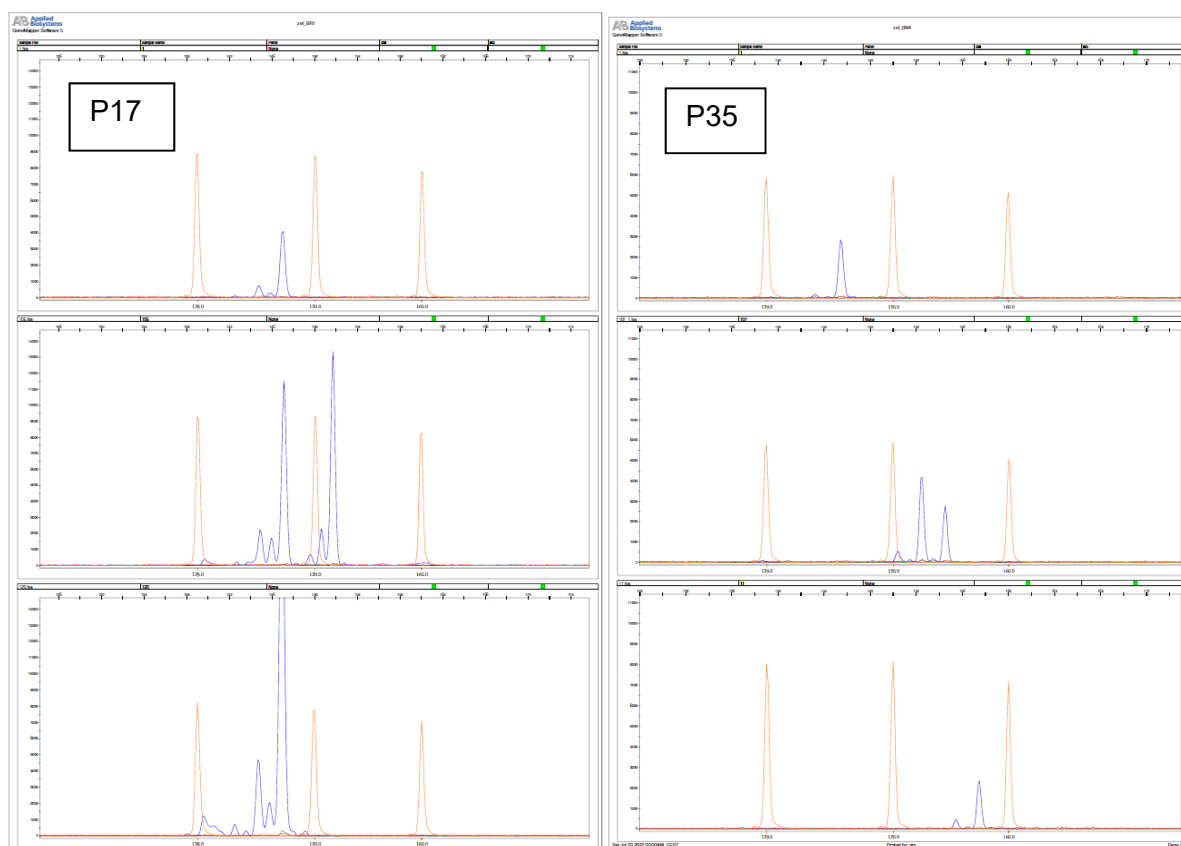
Obrazová příloha ukázek některých SSR markerů na agarózovém gelu



Použitý velikostní marker byl 100 bp od firmy NEB. Testované vzorky: 1(brokolice), 3 (kadeřávek), 5 (kapusta hl.), 19 (kedluben b.), 26 (zelí bílé), 27 (zelí bílé), 86 (ředkev), 103 (zelí čínské).

Obrazová příloha ukávek některých SSR markerů zobrazených pomocí Fragmentační analýzy





Výše vložené obrázky zobrazují ukázkou některých SSR primerů a jejich možných velikostí alel.

Použité roztoky

roztoky pro izolaci DNA

2x CTAB-PVP

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	2%	2 g	10 g	20 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
Tris	100 mM	1,21 g	6,05 g	12,114 g	+HCl = pH 8-8,2
EDTA	20 mM	0,75 g	3,723 g	7,446 g	+NaOH = pH 7,8-8
NaCl	1,4 M	8,2 g	40,915 g	81,83 g	
PVP	1%	1 g	5 g	10 g	
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

5% CTAB

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
CTAB	5%	5 g	25 g	50 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C
NaCl	0,35 M	2,04 g	10,27 g	20,4 g	
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

1x TE pufr

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	10 mM	0,121 g	0,605 g	1,2114 g	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit při 65 °C +HCl = pH 8-8,2
EDTA	1 mM	0,03723 g	0,1865 g	0,3723 g	+NaOH = pH 7,8-8
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

pufr pro elektroforézu

5x TBE

složení	konc.	navážka			poznámka
		100 ml	500 ml	1000 ml	
Tris	0,445 M	5,4 g	27 g	54 g	
kys. boritá	0,445 M	2,75 g	13,75	27,5 g	
EDTA	0,5 mM	2 ml	10 ml	20 ml	doplnit vodou na $\frac{3}{4}$ celkového objemu a rozpustit
dH ₂ O		doplnit do požadovaného objemu			

příprava agarózového gelu

1,5% v 1xTAE

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

3% v 1xTBE

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

Název: Jozová E. a kol. (2022): Metodika pro hodnocení genetické variability u brukvovitých zelenin (Brassicaceae)

Autorský kolektiv: Ing. Eva Jozová, Ph.D.
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická
Studentská 1668
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy Metodika je dostupná na:

http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Metodiky-zel_ssr-918e47d44f.pdf

Osvědčení o certifikaci UKZUZ 015425/2023.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 31.1.2023 (č.j. MZE-5804/2023-13132), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: jozovae@fzt.jcu.cz

ISBN: 978-80-7394-959-4

