

**Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta**

ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN A SEMENÁŘSTVÍ – NÁVODY DO CVIČENÍ

**Pavλίna Smutná
Ludmila Holková**

**Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta**

ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN A SEMENÁŘSTVÍ – NÁVODY DO CVIČENÍ

**Dr. Ing. Pavlína Smutná
RNDr. Ludmila Holková, Ph.D.**

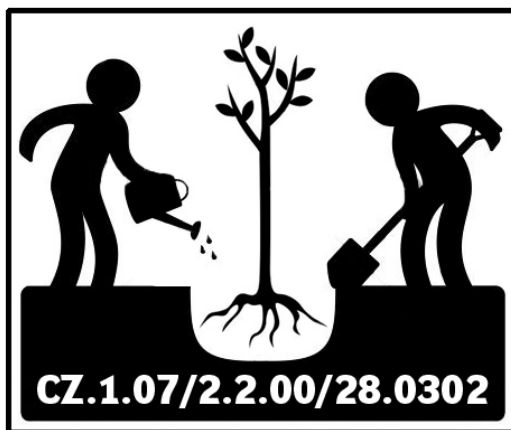
Brno, 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.

Obsah

1	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	4
2	HODNOCENÍ VLASTNOSTÍ ROSTLIN A METODY VÝBĚRU	6
2.1	Hodnocení a porovnání jednotlivých znaků.....	7
2.2	Ověření významnosti rozdílů mezi průměry pomocí intervalů spolehlivosti	9
3	HODNOCENÍ ZÁVISLOSTI MEZI DVĚMA ZNAKY	12
3.1	Hodnocení závislosti mezi znaky.....	13
3.2	Regresní analýza	18
4	STANDARDIZACE A TRANSFORMACE HODNOT	23
4.1	Použití standardizace a transformace hodnot	24
5	KŘÍŽENÍ ROSTLIN	27
6	HYBRIDNÍ ŠLECHTĚNÍ – VYUŽITÍ HETEROZNÍHO EFEKTU	29
6.1	Stanovení heterozního efektu u hybridů kukuřice.....	29
6.2	Výpočet a hodnocení GCA a SCA u hybridů	32
7	VYUŽITÍ POZNATKŮ A METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE VE ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN	35
7.1	Přehled a stručné vysvětlení základních pojmů	35
7.2	Struktura, funkce a uspořádání rostlinných genů – základní pojmy	39
7.3	Základní principy metod využívaných v molekulární genetice rostlin	41
7.4	Využití metod molekulární genetiky ve šlechtitelské praxi	45
7.5	Detekce alel genu RHT8 pomocí mikrosatelitního markeru u pšenice seté (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	48
7.6	Detekce polymorfismu v oblasti QTL na chromosomu 6H spojovaného s odolností vůči suchu u ječmene setého (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	56
7.7	Analýza genů VrnH2 u rostlin v potomstvu křížení ječmenů Tadmor x Jersey	62
7.8	Hodnocení normalizované relativní exprese (NRE) genů.....	68
7.9	Hodnocení exprese genu Wrab17 v průběhu usychání rostlin pšenice ozimé	76
8	SYSTÉM PRODUKCE OSIVA A SADBY	82
8.1	Organizace působící v oblasti produkce a kontroly osiv a sadby	82
8.2	Legislativa	83
8.3	Registrace odrůd.....	83
8.4	Produkce rozmnožovacího materiálu rostlin.....	85
8.5	Uznávací řízení.....	88
8.6	Hodnocení množitelského porostu	89
8.7	Hodnocení rozmnožovacího materiálu.....	90
8.8	Testy na vitalitu osiva	108
8.9	Pravost druhu a odrůdy	112
8.10	Produkce a kontrola sadbových brambor	118

1 Úvod do problematiky

Šlechtění rostlin je záměrná činnost využívající vědeckých poznatků a získaných zkušeností šlechtitelů pro vytváření rostlin s optimální kombinací vhodných vlastností (genotyp). Šlechtění jako vědní obor využívá poznatky mnoha teoretických disciplín (genetika, molekulární biologie, botanika, fyziologie, biochemie, biometrika, pěstování a výživa rostlin a rostlinolékařství). Cílem šlechtění je vytvořit novou odrůdu, uplatnitelnou na trhu, kterou je nutné dále udržovat a rozmnožovat → **semenářství**. Nové odrůdy procházejí určitým kontrolním procesem řízeným státem, na jehož základě jsou registrovány, tzn. je možné je množit a legálně prodávat osivo nebo sadbu. Registrované odrůdy obvykle podléhají také **právní ochraně**.

Odrůda – soubor rostlin náležející k nejnižšímu stupni botanického třídění, který lze vymezit projevem znaků vyplývajících z určitého genotypu nebo kombinace genotypů, odlišitelný od každého jiného souboru rostlin projevem nejméně jednoho z těchto znaků a považovaný za jednotku rozmnožovatelnou beze změny (definice uvedená v zákoně 219/2003 Sb.).

Existuje více typů odrůdy, které se od sebe liší fenotypovou homogenitou a způsobem reprodukce, u jednoho druhu se může vyskytovat více typů odrůdy:

1. klony – heterozygotní, fenotypově homogenní, u vegetativně množených druhů (brambory, chmel),
2. linie – homozygotní, fenotypově homogenní, obvyklé u samosprašných druhů (obilniny s výjimkou žita a kukuřice, luskoviny),
3. hybridy – vznikají kontrolovaným křížením dvou a více rodičovských komponent a dále se nereprodukují, heterozygotní, obvykle fenotypově homogenní, u cizosprašných i samosprašných druhů (kukuřice, slunečnice, řepa, řepka, žito, *ječmen*, *pšenice*),
4. populace – heterozygotní, fenotypově heterogenní, u cizosprašných druhů (řepa, řepka, žito, jeteloviny, trávy),
5. syntetické populace – jsou sestavené z více vybraných rodičovských komponent (klony, linie, kmeny), jejichž podíl je definovaný. Komponenty se udržují odděleně. Odrůdy typu syntetické populace je možné na rozdíl od hybridů použít po několik generací bez výrazného snížení výnosu (řepka, vojtěška).

Schéma šlechtění:

1. výběr genotypů s požadovanými vlastnostmi,
2. křížení (hybridizace),
3. hodnocení a selekce nejvhodnějších materiálů ⇒ новоšlechtění,
4. zkoušení a registrace nové odrůdy,
5. udržování a množení nové odrůdy ⇒ udržovací šlechtění,
6. produkce komerčního osiva, uplatnění odrůdy na trhu (marketing).

Úspěch šlechtitelské činnosti závisí především na volbě rodičovských genotypů pro tvorbu výchozí populace a na metodách použitých pro hodnocení a výběr materiálu s požadovanými vlastnostmi. Použití matematicko-statistických metod při zpracování výsledků přispívá ke zvýšení objektivitu posuzování projevu jednotlivých znaků a vlastností a zvyšuje efektivitu selekce.

Základní postupy použitelné při šlechtění jsou popsány v následujících kapitolách formou jednoduchých příkladů.

2 Hodnocení vlastností rostlin a metody výběru

Definice:

Kmen – bezprostřední potomstvo jedné rostliny vzniklé generativně, bez ohledu na způsob opylení.

Rodina – potomstvo kmene vzniklé cizosprášením. V následných generacích se toto potomstvo označuje jako rod.

Linie – potomstvo homozygotní rostliny vzniklé samoopylením, je homozygotní, fenotypově homogenní. Odrůda typu linie sestává z identických izolinií.

Záměrný výběr (selekce) je nejdůležitější nástroj šlechtění. Podle účelu a způsobu provedení lze rozlišit několik selekčních postupů:

- pozitivní x negativní,
- přímá x nepřímá (využití genetické vazby mezi znaky),
- jednorázová x opakovaná,
- jeden znak x více znaků,
- hromadná x individuální.

Cvičení je zaměřeno na hodnocení vlastností dvou linií pšenice ozimé, budou sledovány znaky mající vliv na produktivitu klasu a výnos zrna. Výsledky budou statisticky vyhodnoceny a na jejich základě bude vybrána linie s lepšími vlastnostmi. Vzhledem k časovému limitu cvičení budou hodnoceny pouze jednotlivé klasy. Pozitivní výběr u obilnin se v praxi obvykle provádí na základě hodnocení celých řádků nebo mikroparcel. Rozbor a hodnocení celých rostlin je komplexnější, získáváme ucelenější informace o rostlině, klasový výběr je úspornější z hlediska času a práce, je však použitelný pouze v určitých situacích, např. pro jednorázový výběr z hybridní populace nebo při udržovacím šlechtění.

Materiál a pomůcky:

- rostliny dvou linií pšenice,
- rozborové archy,
- kalkulačky, pravítka, misky, pinzety, laboratorní váhy,
- statistické tabulky.

Postup: rozbor rostlin se provádí podle znaků uvedených v rozborovém archu. Do nevyvinutých klásků zařazujeme i ty na bázi klasu. Hustota klasu se vypočítá podle vzorečku:

$$H = \frac{\text{počet článků klasového větene} * 100}{\text{délka klasového větene (mm)}}$$

H menší než 24 - řídký klas; 24 - 30 středně hustý; 30 - 40 hustý; nad 40 velmi hustý.

Hmotnost klasu i hmotnost zrn v gramech se váží s přesností 0,1 g.

Rozborový arch pro pšenici

Znak	Pořadové číslo klasu			
	1	2	3	4
1) délka klasu (cm)				
2) hmotnost klasu (g)				
3) počet plodných klásků				
4) délka klasového větene (mm)				
5) počet článků klasového větene				
6) hustota klasu				
7) počet zrn v klasu				
8) průměrný počet zrn na jeden plodný klásek				
9) hmotnost zrn v klasu (g)				
10) hmotnost 1000 zrn (g)				
11) % hmotnosti zrna z hmotnosti klasu				

2.1 Hodnocení a porovnání jednotlivých znaků

Základní soubor je často velmi rozsáhlý (celá populace) a není možné ho kompletně vyhodnotit. Proto se pro hodnocení vytváří soubory s nižším počtem jedinců, tzv. výběrové soubory, které by měly co nejlépe reprezentovat základní soubor. Velikost výběrového souboru lze stanovit podle variability hodnocených znaků, znaky s vyšší variabilitou je nutné hodnotit na rozsáhlejších souborech. Provedení výběru a rozsah výběrového souboru ovlivní přesnost odhadů sledovaných parametrů základního souboru.

Proměnné (znaky) jsou hodnoty, které se zjišťují na zkoumaných jedincích nebo objektech předem definovaným způsobem (vážení, stanovení listové pokrývnosti, měření obsahu tuku v semeni).

Proměnné lze rozdělit do dvou základních skupin:

- kvalitativní (slovně popsatelné, např. barva květu, tvar listu),
- kvantitativní (vyjádřitelné číslem, měřitelné, např. váha, výška, počet semen).

Typ proměnné rozhoduje o použitelnosti jednotlivých statistických metod pro zpracování dat.

Základní statistické charakteristiky používané pro výběrové soubory (u kvantitativních proměnných):

Aritmetický průměr (\bar{x}) – nejčastěji používaná střední hodnota, zastupuje všechny naměřené hodnoty, nepodává informace o počtu hodnot ani o kolísání měřeného znaku.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Rozptyl (s^2) – průměrná kvadratická odchylka jednotlivých hodnot od aritmetického průměru, je vždy nezáporný, je to nejmenší ze všech průměrných čtvercových odchylek.

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}$$

x_i – jednotlivé hodnoty v souboru ($x_1 - x_n$)

n – počet hodnot v souboru

Směrodatná odchylka (s) – druhá odmocnina z rozptylu. Udává stupeň kolísání hodnot určitého znaku od průměru v jednotkách znaku. Není vhodná pro porovnávání variability různých znaků.

$$s = \sqrt{s^2}$$

Střední chyba průměru ($s_{\bar{x}}$) – charakterizuje přesnost výběrového průměru (míra variability průměrů z mnoha nezávislých výběrů stejného rozsahu).

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Variační koeficient (v) – charakterizuje variabilitu znaku v procentech, je vhodný pro porovnávání variability znaků s různým měřítkem.

$$v = \frac{s}{\bar{x}} * 100 (\%)$$

Příklad: Výpočet statistických charakteristik pro délku klasu (cm)

Číslo klasu	Délka klasu x_i	x_i^2	$(x_i - \bar{x})^2$
1	10	100	1,69
2	11	121	0,09
3	10	100	1,69
4	12	144	0,49
5	12	144	0,49
6	13	169	2,89
7	11	121	0,09
8	11	121	0,09
9	11	121	0,09
10	13	169	2,89
11	10	100	1,69
12	11	121	0,09
13	11	121	0,09
14	13	169	2,89
15	11	121	0,09
16	12	144	0,49
17	11	121	0,09
18	11	121	0,09
19	10	100	1,69
20	12	144	0,49
Σ	226	2572	18,2
\bar{x}	11,3		

aritmetický průměr

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{226}{20} = 11,3$$

rozptyl

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{18,2}{19} = 0,96$$

nebo

$$s^2 = \frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1} = \frac{2572 - \frac{51076}{20}}{19} = 0,96$$

směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0,96} = 0,98$$

střední chyba průměru

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,98}{\sqrt{20}} = 0,22$$

variační koeficient

$$v = \frac{s}{\bar{x}} * 100 = \frac{0,98}{11,3} * 100 = 8,67 (\%)$$

2.2 *Ověření významnosti rozdílů mezi průměry pomocí intervalů spolehlivosti*

Interval spolehlivosti (konfidenční interval) je interval, ve kterém s určitou spolehlivostí leží průměrná hodnota základního souboru. Hranice intervalu vypočítáme tak, že k aritmetickému průměru přičteme a odečteme násobek střední chyby průměru a kritické hodnoty pro předem volenou pravděpodobnost a odpovídající stupeň volnosti (viz příloha Kritické hodnoty Studentova t-rozdělení).

Tuto jednoduchou metodu lze použít pro vyhodnocení a porovnání většího počtu výběrových souborů, a to se statistickou významností. Je vhodná i pro hodnocení souborů o nesterénné velikosti. Různý počet pozorování se zohlední pomocí tabulkové hodnoty. Velikost intervalu je ovlivněná variabilitou hodnot, počtem hodnot a zvolenou pravděpodobností.

Výpočet hranic intervalů spolehlivosti pro aritmetický průměr

Z naměřených hodnot, např. hmotnost semen z klasu, spočítáme aritmetický průměr a střední chybu průměru. V tabulkách kritických hodnot Studentova t-rozdělení najdeme odpovídající t-hodnoty pro zvolenou hladinu významnosti ($\alpha=0,05$; $\alpha=0,01$) a stupně volnosti podle počtu hodnot v souboru ($df = n-1$). Přičtením násobku střední chyby a tabulkové hodnoty k průměru získáme horní mez intervalu, odečtením násobku pak dolní mez. Hranice kolem průměru pak se zvolenou pravděpodobností zahrnují kolísání hodnot populace.

$$IS = \bar{x} \pm s_{\bar{x}} \cdot t_{(\alpha;df)}$$

Příklad – výpočet intervalu spolehlivosti pro průměrnou délku klasu

$$\bar{x} = 11,3$$

$$s_{\bar{x}} = 0,22$$

$$n = 20$$

$$df = n - 1 = 19$$

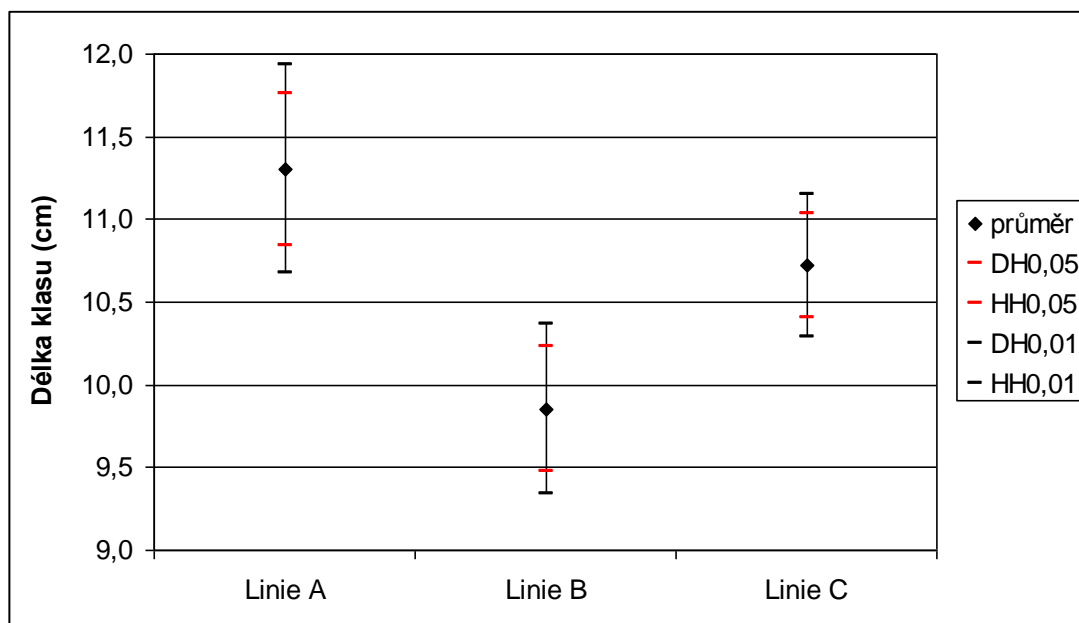
$$t_{(0,05;19)} = 2,093 \quad t_{(0,01;19)} = 2,860$$

Linie	Znak	\bar{x}	$s_{\bar{x}}$	$t_{(0,05;19)}$	DH _{0,05}	HH _{0,05}	$t_{(0,01;19)}$	DH _{0,01}	HH _{0,01}
A	Délka klasu	11,30	0,22	2,093	10,84	11,76	2,860	10,67	11,93
B	Délka klasu	9,85	0,18	2,093	9,47	10,23	2,860	9,34	10,36
								
								

Interpretace výsledků:

1. intervaly konstruované pro určitou hladinu významnosti se překrývají = soubory nejsou ve sledovaném znaku statisticky odlišné s pravděpodobností odpovídající zvolené hladině významnosti (0,05 = 95 %; 0,01 = 99 %).
2. intervaly se nepřekrývají = porovnávané soubory jsou ve sledovaném znaku statisticky významně odlišné s pravděpodobností odpovídající zvolené hladině významnosti.
3. v případě použití obou hladin významnosti (0,05 a 0,01) může nastat situace, kdy se překrývají pouze intervaly pro 0,01. Zjištěný rozdíl je pak statisticky průkazný pouze s pravděpodobností 95 %.

Grafické vyhodnocení se provádí tak, že se sestrojí úsečka mezi průměrem a hranicí dolního a horního intervalu (Obr. 1).



Obr. 1 Graf intervalů spolehlivosti pro délku klasu u pšenice

Vyhodnocení:

1. Hranice intervalů konstruovaných pro hladiny významnosti 0,05 i 0,01 pro průměrnou délku klasů linie A a linie B se nepřekrývají, průměrná délka klasů linie A se statisticky významně liší od průměrné délky klasů linie B.
2. Průměrná délka klasů linie A se statisticky významně neliší od průměrné délky klasů linie C.
3. Průměrná délka klasů linie B se statisticky významně liší od průměrné délky klasů linie C pouze s pravděpodobností 95 %.

Na základě hodnocení lze vybrat linii, která je statisticky významně lepší v požadovaných znacích. (Pozn.: Ne vždy je vyšší průměrná hodnota žádoucí, např. u délky stébla mohou být preferovány kratší rostliny z důvodu menší poléhavosti).

3 Hodnocení závislosti mezi dvěma znaky

Existence silné závislosti mezi dvěma znaky může ovlivnit šlechtitelský proces pozitivním nebo negativním způsobem. V případě silné vazby mezi obtížně hodnotitelným znakem (např. obsah taninu v semenech bobu) a snadno identifikovatelným znakem (barva květu) je možné provádět selekci pouze podle barvy květu a tím dosáhnout snížení množství taninu v semenech. Pokud existuje silná negativní vazba mezi dvěma znaky, např. mezi výnosem a kvalitou zrna u pšenice, selekcí rostlin s nejvyšším výnosem dojde ke snížení kvality.

Cílem cvičení je provést rozbor rostlin sóji a analyzovat získané údaje z hlediska vztahů mezi jednotlivými znaky.

Materiál a pomůcky:

- rostliny sóji (1 odrůda),
- rozborové archy,
- laboratorní váhy,
- pravítka, posuvná měřítka,
- misky,
- kalkulačky.

Postup: provede se rozbor přidělené rostliny a zjištěné údaje se zapíše do rozborového archu.

Rozborový arch pro sóju

Znak	Hodnocení	
1. délka rostliny (cm)		
2. výška nasazení 1. lusku (cm)		
3. počet plodných větví (cm)		
4. počet internodií		
5. počet lusků na rostlině		
6. počet prasklých lusků		
7. počet semen na rostlině		
8. hmotnost semen na rostlině (g)		
9. průměrný počet semen v lusku		
10. HTS (g)		

3.1 Hodnocení závislosti mezi znaky

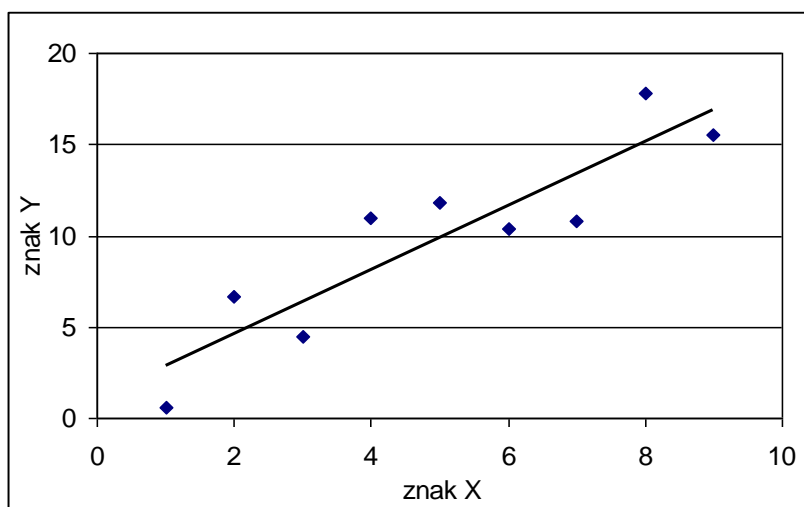
Pokud u souboru sledujeme více znaků, zajímá nás, jestli je mezi nimi nějaký vztah. Vztahy mezi dvěma a více proměnnými se hodnotí pomocí **korelační a regresní analýzy**.

Cílem korelační analýzy je zjistit, jestli jsou dva znaky na sobě závislé, a vyjádřit sílu vztahu mezi nimi (těsnost závislosti). Pro hodnocení síly vztahu se používá korelační koeficient nebo koeficient determinace.

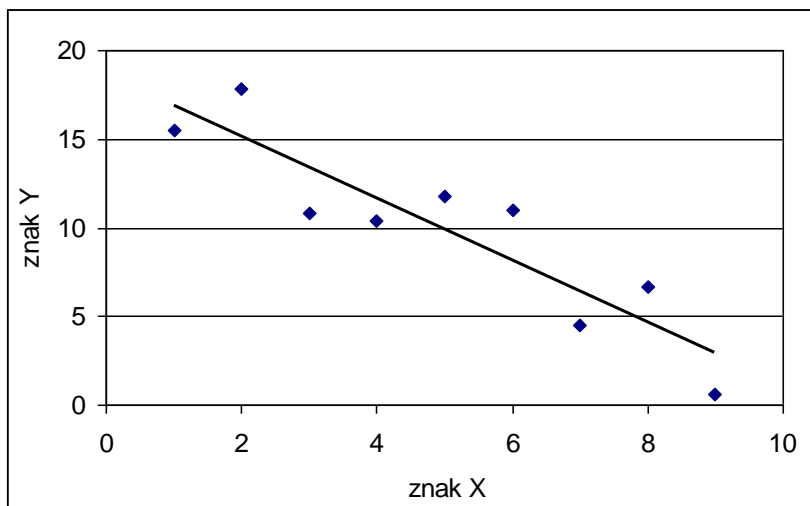
Cílem regresní analýzy je zjistit, jaký vztah mezi proměnnými existuje (lineární, kvadratický) a jestli lze velikost jedné proměnné predikovat pomocí druhé proměnné. Průběh závislosti se popisuje pomocí matematické funkce.

Dvě proměnné jsou korelované v případě, že určité hodnoty jedné proměnné mají tendenci se vyskytovat s určitými hodnotami druhé proměnné. Volná závislost – jedna proměnná ovlivňuje druhou s určitou pravděpodobností a v různé intenzitě (např. vztah mezi výškou a hmotností jedince). Pevná závislost – hodnotě jedné proměnné přesně odpovídá hodnota druhé proměnné (v biologických vědách se nevyskytuje).

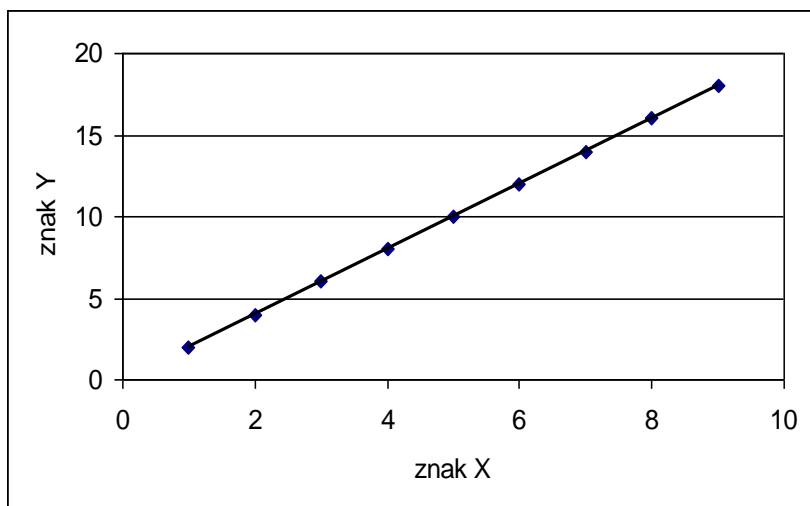
Typ závislosti lze ověřit pomocí bodového grafu sestrojeného pro oba zkoumané znaky. Pokud je možné vyneseny body proložit přímkou, pokládáme vztah za lineární. Z bodového grafu je možné dále posoudit těsnost vztahu, přítomnost odlehlých hodnot a homogenitu dat (body by měly být rozmístěny rovnoměrně kolem přímkou, neměly by tvořit výrazné shluky, vzdálenost jednotlivých bodů od přímkou by neměla výrazně růst nebo klesat s rostoucí hodnotou znaku X). Příklady závislostí jsou zobrazeny v následujících grafech (Obr. 2 – Obr. 6).



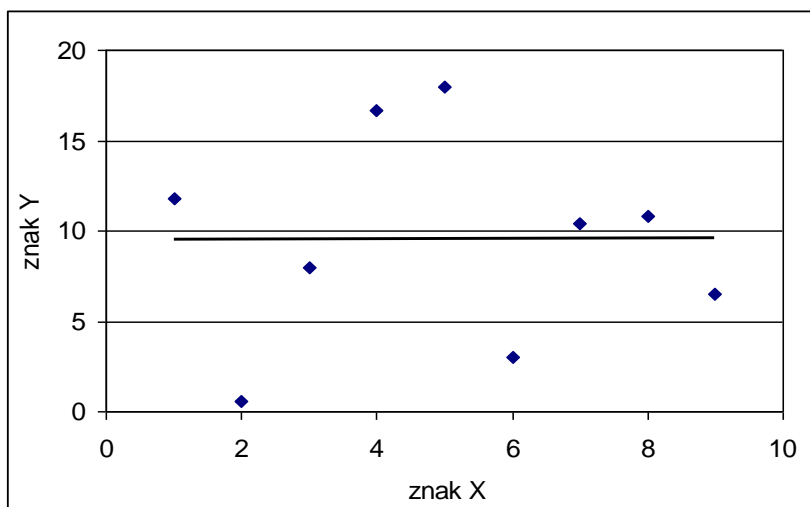
Obr. 2 Volná lineární závislost mezi znaky X a Y ($r = 0,9$)



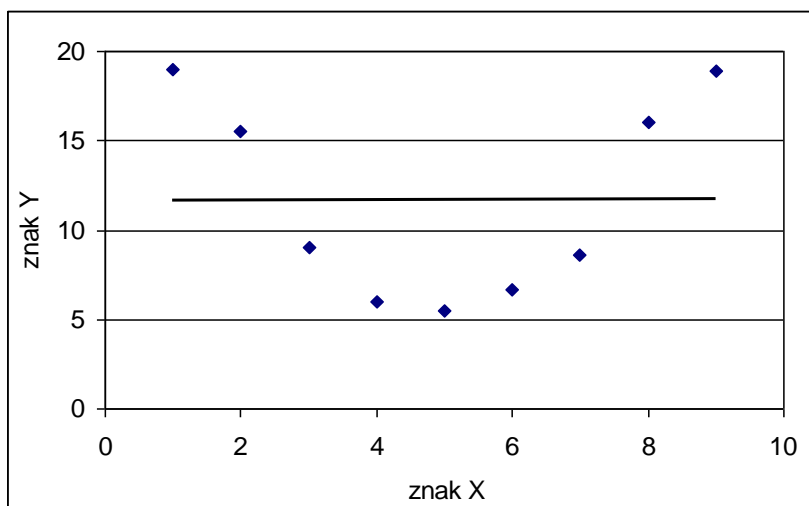
Obr. 3 Volná lineární závislost mezi znaky X a Y ($r = -0,9$)



Obr. 4 Pevná lineární závislost mezi znaky X a Y ($r = 1$)



Obr. 5 Znaky X a Y spolu nekorelují ($r = 0$)



Obr. 6 Nelineární závislost mezi znaky X a Y nelze hodnotit pomocí korelačního koeficientu a lineární regresní analýzy

Síla vztahu mezi dvěma znaky kvantitativního charakteru (číselné hodnoty) se nejčastěji posuzuje pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (r), nebo koeficientu determinace (r^2).

Pearsonův korelační koeficient:

- bezrozměrný ukazatel, obvykle se značí písmenem r ,
- je vhodný pro posouzení síly vztahu dvou kvantitativních proměnných,
- nabývá hodnot od -1 do $+1$, znaménko udává směr závislosti,
- pokud je rovný 1 (-1), všechny body leží v přímce,
- pokud je rovný 0 , proměnné spolu nekorelují,
- je vhodný pro vyjádření síly lineárního vztahu, sílu nelineárních vztahů charakterizuje nepřesně,
- je výrazně ovlivněn odlehlými hodnotami,
- je výrazně ovlivněn nepřesností měření obou proměnných,
- je ovlivněn rozsahem výběru,
- není vhodný v případě, že některá z proměnných nemá náhodný charakter (její hodnoty jsou pevně stanoveny),
- vysoký korelační koeficient není důkazem silného vztahu, tedy toho, že změny jedné proměnné skutečně zapříčiňují změny druhé proměnné (např. efekt třetí skryté proměnné),
- druhá mocnina korelačního koeficientu se nazývá koeficient determinace a nabývá hodnot od 0 do $+1$.

Provedení výpočtu korelačního koeficientu: Každý student dostane přidělenou dvojici znaků z rozborového archu, údaje zapíše do tabulky a podle vzorečků provede výpočet korelačního koeficientu včetně stanovení statistické významnosti.

Číslo rostliny	znak X	znak Y	x_i^2	y_i^2	$x_i y_i$
1	x_1	y_1	x_1^2	y_1^2	$x_1 y_1$
2	x_2	y_2	x_2^2	y_2^2	$x_2 y_2$
...					
...					
n	x_n	y_n	x_n^2	y_n^2	$x_n y_n$
	$\sum x_i$	$\sum y_i$	$\sum x_i^2$	$\sum y_i^2$	$\sum x_i y_i$

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 * \sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

$$r = \frac{C}{\sqrt{A * B}}$$

$$A = \sum(x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

$$B = \sum(y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

$$C = \sum(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i * \sum y_i}{n}$$

Těsnost vztahu mezi dvěma znaky posoudíme podle hodnoty korelačního koeficientu r:

- do 0,2 mezi vlastnostmi není vztah
- 0,2 – 0,4 slabý vztah
- 0,4 – 0,6 středně silný vztah
- 0,6 – 0,8 silný vztah
- 0,8 – 0,99 velmi silný vztah
- 1 úplná korelace

Statistickou významnost korelačního koeficientu lze ověřit pomocí t-testu:

$$t_{(n-2)} = |r| \cdot \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

Vypočítanou t-hodnotu porovnááme s kritickou hodnotou Studentova t-rozdělení (viz příloha) pro stanovenou hladinu významnosti (0,05) a odpovídající stupně volnosti ($n-2$; n odpovídá počtu hodnocených rostlin). Pokud je vypočítaná hodnota větší než tabulková, považujeme korelační koeficient za statisticky významný (významně se lišící od nuly). Pokud je vypočítaná hodnota menší než tabulková, považujeme korelační koeficient za statisticky nevýznamný. Významnost je možné také určit porovnáním vypočítaného koeficientu s kritickými hodnotami pro Pearsonův koeficient korelace vyhledanými podle počtu hodnocených jedinců (viz příloha Kritické hodnoty pro Pearsonův korelační koeficient). Toto testování je závislé především na počtu hodnot, z kterých byl korelační koeficient vypočítán. Pro vyšší počty pozorování lze prokázat statistickou významnost i velmi malého korelačního koeficientu, neznamená to však existenci silného vztahu mezi znaky.

Příklad výpočtu korelačního koeficientu pro znaky počet lusků na rostlině (X) a počet semen na rostlině (Y).

Tab. 1 Údaje o počtu lusků a počtu semen na rostlině

Číslo rostliny	Počet lusků (X)	Počet semen (Y)	x_i^2	y_i^2	$x_i \cdot y_i$
1	25	68	625	4624	1700
2	30	80	900	6400	2400
3	19	52	361	2704	988
4	38	91	1444	8281	3458
5	24	65	576	4225	1560
6	29	70	841	4900	2030
7	32	75	1024	5625	2400
8	37	83	1369	6889	3071
9	30	82	900	6724	2460
10	40	102	1600	10404	4080
11	27	64	729	4096	1728
12	29	69	841	4761	2001
13	34	78	1156	6084	2652
14	22	65	484	4225	1430
15	28	76	784	5776	2128
16	32	82	1024	6724	2624
17	21	66	441	4356	1386
18	33	85	1089	7225	2805
19	26	71	676	5041	1846
20	29	82	841	6724	2378
Σ	585	1506	17705	115788	45125
\bar{x}	29	75			

$$A = \Sigma(x_i - \bar{x})^2 = \Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n} = 17\,705 - \frac{585^2}{20} \doteq 594$$

$$B = \Sigma(y_i - \bar{y})^2 = \Sigma y_i^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{n} = 115\,788 - \frac{1\,506^2}{20} \doteq 2\,386$$

$$C = \Sigma(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y}) = \Sigma x_i y_i - \frac{\Sigma x_i * \Sigma y_i}{n} = 45\,123 - \frac{585 * 1\,506}{20} \doteq 1\,074$$

$$r = \frac{C}{\sqrt{A * B}} = \frac{1\,074}{\sqrt{594 * 2\,386}} = 0,90$$

Korelační koeficient má hodnotu 0,90.

Testování statistické významnosti vypočítaného korelačního koeficientu:

$$t_{\text{vyp.}} = |r| \cdot \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} = 0,90 * \sqrt{\frac{18}{1-0,81}} \doteq 8,76$$

$$t_{(0,05;18)} = 2,101 \quad t_{(0,01;18)} = 2,87$$

Vypočítaná t-hodnota (8,76) je vyšší než kritické tabulkové hodnoty pro hladinu významnosti 0,05 i 0,01. Korelační koeficient 0,90 je statisticky vysoce významný.

Závěr: mezi počtem lusků a počtem semen na rostlině byl zjištěn kladný, velmi silný a statisticky vysoce významný vztah.

3.2 Regresní analýza

Cílem regresní analýzy je najít optimální rovnici pro přímku (křivku), která nejlépe odpovídá empirickým hodnotám obou proměnných a která může být využita pro odhad hodnot závisle proměnné podle hodnot nezávisle proměnné. Průběh závislosti je tedy vyjádřený prostřednictvím matematické funkce.

Rovnice jednoduché lineární regrese:

$$y' = a + bx$$

y' – závisle proměnná; x – nezávisle proměnná

a – absolutní člen regresní funkce, udává počátek funkce

b – regresní koeficient, udává o kolik se teoreticky změní hodnota závisle proměnné y , když hodnotu nezávisle proměnné x zvýšíme o jednotku.

Pokud vyjde regresní koeficient záporný, znamená to, že s rostoucími hodnotami jednoho znaku hodnoty druhého znaku klesají.

Pro výpočet je nutné předem stanovit, který znak budeme považovat za závislý a který za nezávislý. Regresní koeficient pro závislost znaku Y na X se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$b_{yx} = \frac{C}{A} \qquad b_{yx} = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Statistickou významnost regresního koeficientu je možné ověřit podobným způsobem, jako u korelačního koeficientu. Vypočítaná hodnota se porovnává s kritickou hodnotou pro volenou hladinu významnosti a odpovídající stupně volnosti.

$$sb_{yx} = \sqrt{\frac{B - \frac{C^2}{A}}{(n-2) * A}} \qquad t_{vyp.} = \frac{b_{yx}}{sb_{yx}}$$

Hodnotu absolutního členu lze vypočítat podle vztahu:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Podle charakteru znaků může být regrese jednostranná nebo oboustranná. V případě oboustranné závislosti má význam počítat také závislost znaku X na Y :

$$b_{xy} = \frac{C}{B} \qquad b_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

$$sb_{xy} = \sqrt{\frac{A - \frac{C^2}{B}}{(n-2) * B}} \qquad t_{vyp.} = \frac{b_{xy}}{sb_{xy}}$$

Příklad výpočtu regresního koeficientu pro vztah mezi počtem lusků a počtem semen na rostlině (Tab. 1) a ověření jeho statistické významnosti:

$$b_{yx} = \frac{C}{A} = \frac{1\,074}{594} = 1,81$$

$$sb_{yx} = \sqrt{\frac{B - \frac{C^2}{A}}{(n-2) * A}} = \sqrt{\frac{2\,386 - \frac{1\,074^2}{594}}{18 * 594}} = 0,20$$

$$t_{vyp.} = \frac{b_{yx}}{sb_{yx}} = \frac{1,81}{0,20} = 9,05$$

Příklad výpočtu regresního koeficientu pro vztah mezi počtem semen a počtem lusků na rostlině (Tab. 1) a ověření jeho statistické významnosti:

$$b_{xy} = \frac{C}{B} = \frac{1\,074}{2\,386} = 0,45$$

$$sb_{xy} = \sqrt{\frac{A - \frac{C^2}{B}}{(n-2) * B}} = \sqrt{\frac{594 - \frac{1\,074^2}{2\,386}}{18 * 2\,386}} = 0,05$$

$$t_{vyp.} = \frac{b_{xy}}{sb_{xy}} = \frac{0,45}{0,05} = 9,00$$

$$t_{(0,05;18)} = 2,101 \quad t_{(0,01;18)} = 2,87$$

Oba regresní koeficienty jsou statisticky vysoce významné.

Při oboustranné závislosti je možno graficky znázornit obě závislosti pomocí dvou přímek, z nichž jedna znázorní závislost Y na X, druhá X na Y. Konstrukce přímky je možná, pokud jsou známy alespoň dva body, jimiž je proložena. Souřadnice těchto bodů je možné vypočítat pomocí následující rovnice. Pro výpočet je nutné zvolit v rámci rozsahu nezávisle proměnné dvě hodnoty a dopočítat odpovídající teoretické hodnoty závisle proměnné. Z praktických důvodů je vhodné volit hodnoty blízké minimu a maximu.

$$y'_i = \bar{y} + b_{yx} * (x_1 - \bar{x})$$

Závislost mezi počtem lusků (X) a počtem semen (Y)

$x_1=20$; $x_2=40$

$$y'_1 = \bar{y} + b_{yx} * (x_1 - \bar{x}) \doteq 75 + 0,81 * (20 - 29) \doteq 59$$

$$y'_2 = \bar{y} + b_{yx} * (x_2 - \bar{x}) \doteq 75 + 0,81 * (40 - 29) \doteq 95$$

Závislost mezi počtem semen (Y) a počtem lusků (X)

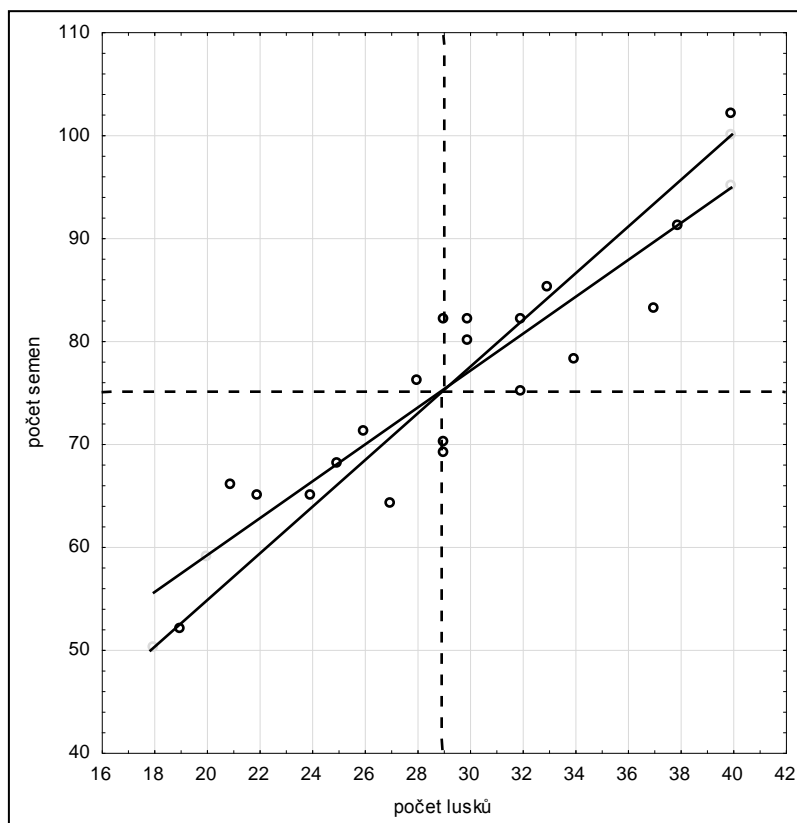
$y_1=50$; $y_2=100$

$$x'_1 = \bar{x} + b_{xy} * (y_1 - \bar{y}) \doteq 29 + (0,45 * (50 - 75)) \doteq 18$$

$$x'_2 = \bar{x} + b_{xy} * (y_2 - \bar{y}) \doteq 29 + (0,45 * (100 - 75)) \doteq 40$$

Při grafickém zobrazení vytvoříme přímky podle vypočítaných souřadnic:

- závislost mezi počtem lusků a počtem semen [20; 59] a [40; 95]
- závislost mezi počtem semen a počtem lusků [18; 50] a [40; 100]



Obr. 7 Grafické zobrazení oboustranné závislosti mezi počtem lusků a počtem semen na rostlině

Obě přímky musí procházet průsečíkem kolmic vztyčených z hodnot aritmetických průměrů obou znaků. Nejvhodnější rostliny z hlediska projevu obou znaků jsou umístěny v pravém horním kvadrantu grafu (Obr. 7). Úhel, který svírají obě přímky, odpovídá síle vztahu mezi oběma znaky, čím silnější vztah (vyšší r), tím je úhel menší. V případě úplné korelace ($r=1$) se přímky překrývají.

4 Standardizace a transformace hodnot

Pro porovnávání znaků s různými jednotkami a měřítky lze použít standardizaci hodnot. Tato procedura odstraní absolutní hodnoty, ale umožní srovnat jednotlivé odrůdy z hlediska více znaků současně. Ve cvičení bude sledována hodnota stonků přadného lnu, která je charakterizována délkou, tloušťkou, tvarem a výškou rozvětvení. Tyto znaky souvisí s množstvím a jakostí vlákna.

Materiál a pomůcky:

- rostliny přadného lnu,
- rozborové archy,
- laboratorní váhy,
- pravítka, posuvná měřítka,
- misky,
- kalkulačky.

Postup: podle znaků uvedených v rozborovém archu se provede hodnocení rostlin lnu, získané hodnoty se zapíší. U vybraných znaků se spočítají standardizované a transformované hodnoty a provede se grafické vyhodnocení.

Znaky hodnocené u přadného lnu

	Znak	1. rostlina	2. rostlina
1	celková délka rostliny (cm)		
2	technická délka (cm)		
3	hmotnost technické části rostliny (g)		
4	tloušťka stonku u kořene (mm)		
5	tloušťka stonku pod rozvětvením (mm)		
6	tloušťka stonku v polovině technické délky (mm)		
7	štíhlost stonku (výpočet)		
8	koeficient zúžení (sbíhavost)		
9	počet tobolek		
10	hmotnost semen (g)		
11	počet semen		
12	počet semen na 1 tobolku		
13	HTS (g)		

Poznámky:

1. Celková délka rostliny – měří se od děložního kolénka (vrchol hypokotyly) k nejvyššímu vrcholu větvení (včetně tobolky).
2. Technická délka – od děložního kolénka k I. větvení.
5. Větvení stonku – rozdíl mezi celkovou a technickou délkou stonku cm.
6. Tloušťka stonku se vždy hodnotí ve vztahu k délce, obvykle 0,5–3 mm, kratší stonky bývají tenčí. Optimální tloušťka 1,3 až 1,7 mm. Tloušťka má značný vliv na průběh rosení a výdajnost vlákna, tenké stonky se déle rosí. Delší, jemnější a štíhlejší stonek obsahuje více vlákna s vyšší kvalitou.
7. Štíhlost stonku se vypočítá podle následujícího vzorce, optimální štíhlost 520–540.

$$\text{štíhlost} = \frac{\text{technická délka(mm)}}{\text{tloušťka stonku v polovině technické délky(mm)}}$$

8. Koeficient zúžení (sbíhavost) charakterizuje tvar stonku, válcovitý stonek (s menším koeficientem zúžení) poskytuje jakostnější vlákno, kuželovitý (sbíhavý) stonek pak méně jakostní vlákno. Nižší koeficient zúžení je lepší. Velmi jemné a velmi hrubé stonky jsou nežádoucí.

$$\text{sbíhavost} = \frac{\text{tloušťka stonku u kořene} - \text{tl. stonku pod rozvětvením}}{2}$$

4.1 Použití standardizace a transformace hodnot

Tato metoda umožňuje celkové posouzení rostliny z hlediska několika odlišných znaků. Po standardizaci je možné bez ohledu na měřítko určit, v kterém znaku je odrůda podprůměrná a v kterém nadprůměrná. Metodu je možné použít také pro znaky, u kterých jsou stanoveny minimální nebo maximální limity, např. pro porovnání sladovnické kvality odrůd ječmene.

Výpočet: Ze všech získaných hodnot se pro vybrané znaky vypočítá aritmetický průměr a směrodatná odchylka platné pro celý soubor. S pomocí těchto údajů studenti provedou standardizaci a transformaci hodnot pro jednotlivé rostliny. Účelem standardizace je odstranit měřítko, standardizované údaje se pohybují v intervalu -3 až 3, průměr je roven 0.

$$SH = \frac{x_i - \bar{x}}{s} \quad s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}}$$

Z důvodu odstranění záporných hodnot se následně provede transformace přičtením čísla 5, hodnoty budou v intervalu 2 až 8.

$$STH = SH + 5$$

Standardizované a transformované hodnoty (STH) se zapíší do tabulky. Grafické zobrazení se provede pomocí paprskového grafu (Obr. 8), přičemž počet paprsků odpovídá počtu znaků. Jednotlivé rostliny se pak hodnotí podle toho, jestli v konkrétním znaku dosáhly nadprůměrné nebo podprůměrné hodnoty, aritmetickému průměru přísluší hodnota 5.

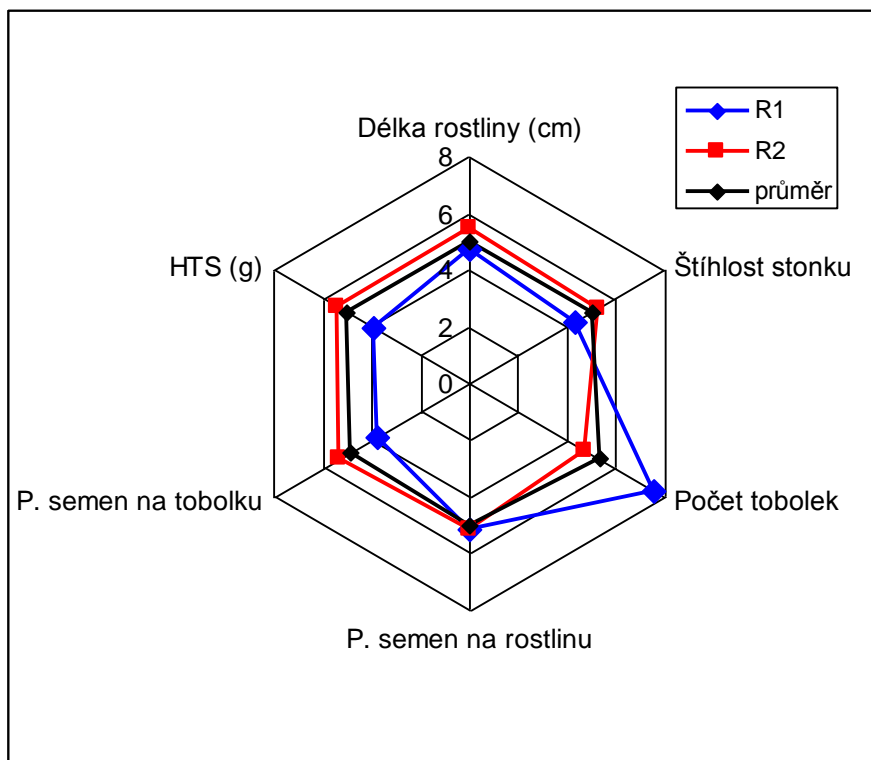
Příklad: Bylo vyhodnoceno 10 rostlin přadného lnu odrůdy Venica. Naměřené hodnoty a hodnoty po standardizaci a transformaci jsou uvedeny v následujících tabulkách 2. a 3.

Tab. 2 Naměřené hodnoty pro 10 rostlin lnu

Znak	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	průměr	s
Délka rostliny (cm)	65	67	69	70	61	64	68	64	65	63	66	2,8
Štíhlost stonku	288	333	294	357	250	321	380	244	394	360	322	52,2
Počet tobolek	12	7	9	8	8	10	5	9	5	7	8	1,7
P. semen na rostlinu	43	43	66	50	55	22	35	33	30	36	41	13,8
P. semen na tobolku	3,6	6,1	7,3	6,3	6,9	2,2	7,0	3,7	6,0	5,1	6	1,7
HTS (g)	6,0	8,1	6,8	7,0	7,3	9,1	5,7	10,1	6,7	8,3	8	1,4

Tab. 3 Standardizované a transformované hodnoty

Znak	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	průměr	s
Délka rostliny (cm)	4,78	5,49	6,19	6,55	3,36	4,42	5,84	4,42	4,85	4,10	5	1
Štíhlost stonku	4,35	5,21	4,46	5,67	3,62	4,98	6,11	3,50	6,38	5,73	5	1
Počet tobolek	7,55	4,68	5,83	5,26	5,26	6,40	3,53	5,83	3,53	4,68	5	1
P. semen na rostlinu	5,14	5,14	6,81	5,65	6,01	3,61	4,56	4,41	4,19	4,63	5	1
P. semen na tobolku	3,80	5,31	6,01	5,37	5,74	2,98	5,81	3,85	5,22	4,72	5	1
HTS (g)	3,91	5,43	4,49	4,63	4,85	6,15	3,69	6,87	4,41	5,57	5	1



Obr. 8 Grafické zobrazení standardizovaných a transformovaných hodnot

Závěr: Rostlina č. 1 dosahuje ve všech hodnocených znacích průměrné nebo nadprůměrné hodnoty s výjimkou znaku počet tobolek. Rostlina č. 2 je podprůměrná ve většině znaků kromě počtu tobolek (Obr. 8).

5 Křížení rostlin

Křížení (hybridizace) se provádí za účelem získání hybridního potomstva, které bude mít znaky a vlastnosti použitých rodičů v různých kombinacích (kombinační křížení). Je to základní šlechtitelská metoda pro tvorbu nových genotypů (odrůd) s požadovanými vlastnostmi. Křížením se zvyšuje genetická variabilita materiálu. Křížení lze z hlediska počtu genotypů, které se podílejí na výsledném hybridním potomstvu, rozdělit na jednoduché (dva genotypy) nebo složité. Složité křížení probíhá ve dvou a více letech v závislosti na počtu rodičovských komponent.

Úspěšnost křížení závisí na znalostech genetického založení sledovaných znaků a jejich dědičnosti, na výběru rodičů a na volbě odpovídající metody a techniky křížení. Podstatou křížení je opylení květu mateřské rostliny pylem otcovské rostliny. Vhodná metoda křížení musí zabránit opylení květu vlastním pylem, což se řeší včasným odstraněním prašníků (kastrace květu mateřské rostliny). Dále je nutné zabránit nežádoucímu a nekontrolovanému opylení, což se řeší izolací kastrovaných květů a zajistit opylení (oplození) funkčním pylem zvolené otcovské rostliny.

Technika křížení závisí na:

- biologii kvetení daného druhu,
- způsobu přenosu pylu,
- stavby a velikosti květu.

Vždy je nutné zajistit synchronizaci kvetení obou rodičů, v případě odlišné délky vegetačních fází je možné použít postupný výsev, předpěstování rostlin ve skleníku, nebo průběžnou redukci květů nebo částí rostliny.

U cizosprašných druhů je nutné vzít v úvahu mechanismus zabraňující samosprašení, např. různá doba dozrávání prašníků a blizen (kukuřice), heterostylie (primule), stavba květu vyžadující pro opylení přítomnost hmyzu (vojtěška), různé formy inkompatibility (žito). Úroveň samosprašnosti závisí nejen na druhu, ale také na vnějších podmínkách (teplota, vlhkost, přítomnost opylovačů).

Pomůcky:

- kvetoucí rostliny (primule, ječmen),
- pinzety, nůžky,

- izolátory,
- štítky pro označení květů,
- štěteček.

Postup křížení:

1. Kastrace – odstranění prašníků za účelem zabránění samoopylení, obvykle ve fázi poupěte, při kastrování nedostatečně vyvinutých květů hrozí vyšší riziko poškození květu, pozdě kastrované květy už mohou být opylené. Prašníky musí být zelené, při rozemnutí nesmí uvolňovat pyl. Během kastrace se u některých druhů (obilniny, řepka) provádí redukce počtu kvítků v květenství.
2. Izolace – zaizolování vykastrovaného květu nebo květenství před nežádoucím sprášením (celofán, papír, síťovina u hmyzosubných rostlin).
3. Sběr pylu – z otcovských rostlin, které práší, životnost pylu je obvykle jen několik hodin, lze prodloužit uchováním při nízkých teplotách. Sběr pylu se provádí v odpoledních hodinách, kdy prašníky pukají.
4. Opylení – přenos funkčního pylu na bliznu vykastrovaného květu, blizny musí být schopné přijmout pyl (nesmí být zaschlé). Přenos pylu pomocí štětečku, vkládání celých prašníků do vykastrovaných květů pinzetou, „twirl“ metoda, opylení hmyzem v izolovaném prostředí. Květy nebo rostliny se označují visačkami s označením rodičů a údaji o termínu kastrace a opylení.
5. Sklizeň hybridních semen se provádí ručně v době zralosti. Semena se obvykle třídí podle jednotlivých kombinací a připraví k seti.

Kastrace může být provedena také chemicky (použití gametocidních přípravků). Při výrobě hybridního osiva se nejčastěji využívá geneticky založená pylová sterilita.

Cytoplazmaticko jaderná pylová sterilita – sterilní cytoplazma se přenáší po matce, zabraňuje tvorbě funkčního pylu. Sterilní mateřská linie se reprodukuje pomocí fertlní izolinie s jaderným genem udržovatele sterility. U většiny druhů je nutné použít pro finální hybrid otcovskou linii nesoucí jaderný gen obnovy fertility, výsledné osivo F_1 generace musí produkovat fertlní rostliny (kukuřice, slunečnice). Výjimkou jsou druhy pěstované pro vegetativní části nebo bezsemenné plody (cukrovka, cibule, meloun).

6 Hybridní šlechtění – využití heterozního efektu

Heteroze – biologický jev projevující se zvýšenou zdatností a vitalitou první generace (F_1), která vznikne zkřížením geneticky odlišných rodičovských komponent. Jako rodičovské komponenty se v hybridním šlechtění používají inbrední linie, ale heteroze se projevuje i po křížení nepříbuzných odrůd nebo při vzdáleném křížení.

Heteroze – vyšší výkon heterozygotů oproti srovnatelným homozygotům, vysvětluje se neaditivními účinky genů, projevuje se u kvantitativně děděných znaků. Nejvyšší projev heteroze je v první generaci po křížení, proto se finální hybridy se dále nepřemnožují, přesevem výkon odrůdy (heterozní efekt) rychle klesá.

6.1 Stanovení heterozního efektu u hybridů kukuřice

Studenti provedou rozbor palic kukuřice ♀ linie, ♂ linie a F_1 hybrida podle rozborového archu.

Rozborový arch pro kukuřici

Znak	1	2	3	4	5	6
1. Hmotnost palice (g)						
2. Délka palice (cm)						
3. Obvod (cm) - spodní část - střed - vrchní část						
4. Tvar palice						
5. Počet řad zrna						
6. Počet zrn v řadě						
7. Počet zrn z palice						
8. Hmotnost zrna (g)						
9. Výtěžnost zrna (%)						
10. HTS						
11. Barva korunky zrna						
12. Barva hřbetní strany zrna						
13. Barva vřetene						

Poznámky:

- délka palice (cm) krátká do 17 cm; středně dlouhá 17–22 cm; dlouhá nad 22 cm,
- tvar palice – konický; konicko-cylindrický; cylindrický,
- počet zrn v řadě (průměr ze tří řad; nízký do 35; střední 35–40; vysoký nad 45),

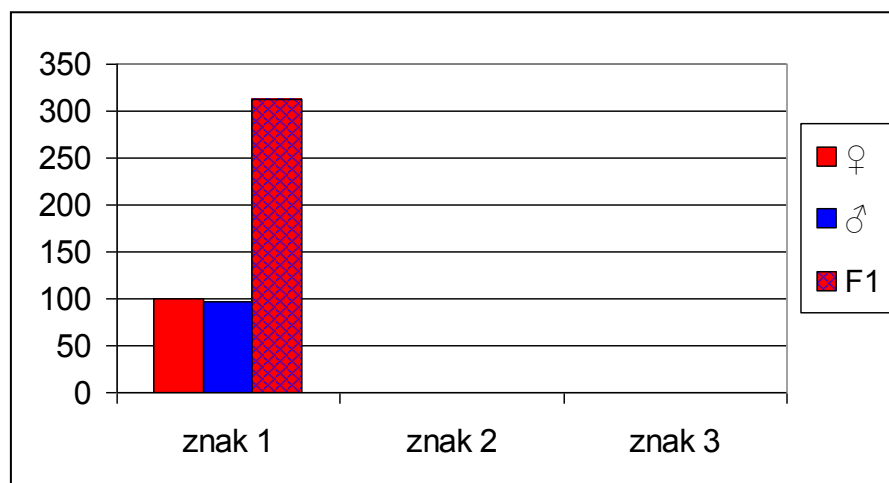
11. a 12. barva zrna: 1. bílá; 2. žlutobílá; 3. žlutá; 4. žlutooranžová; 5. oranžová; 6. červenooranžová; 7. červená; 8. tmavočervená; 9. modročerná,
 13. barva vřetene: bílá; červená.

U vybraných znaků se spočítají průměry za celou skupinu a doplní do tabulky. Heterozní efekt se vypočítá tak, že za 100 % se vezme průměrná hodnota lepšího z rodičů v daném znaku. Vlastní heterozní efekt hybridu se pak vyjádří jako výkon -100 %. Heterozní efekt je možné počítat také podle průměrné hodnoty obou rodičů.

Tabulka pro výpočet heterozního efektu

Znaky	♀ linie		♂ linie		F ₁ hybrid		Heterozní efekt (%)
	průměr	%	průměr	%	průměr	%	
1	62	100	60	97	194	313	213
2							
3							
...							
...							
...							

Zhodnocení výše heterozního efektu u jednotlivých znaků je možné provést také graficky pomocí sloupcového grafu (Obr. 9).



Obr. 9 Grafické vyjádření heterozního efektu

Závěr: Pro znak č. 1 dosáhl heterozní efekt 213 % na průměrnou hodnotu lepšího z rodičů.

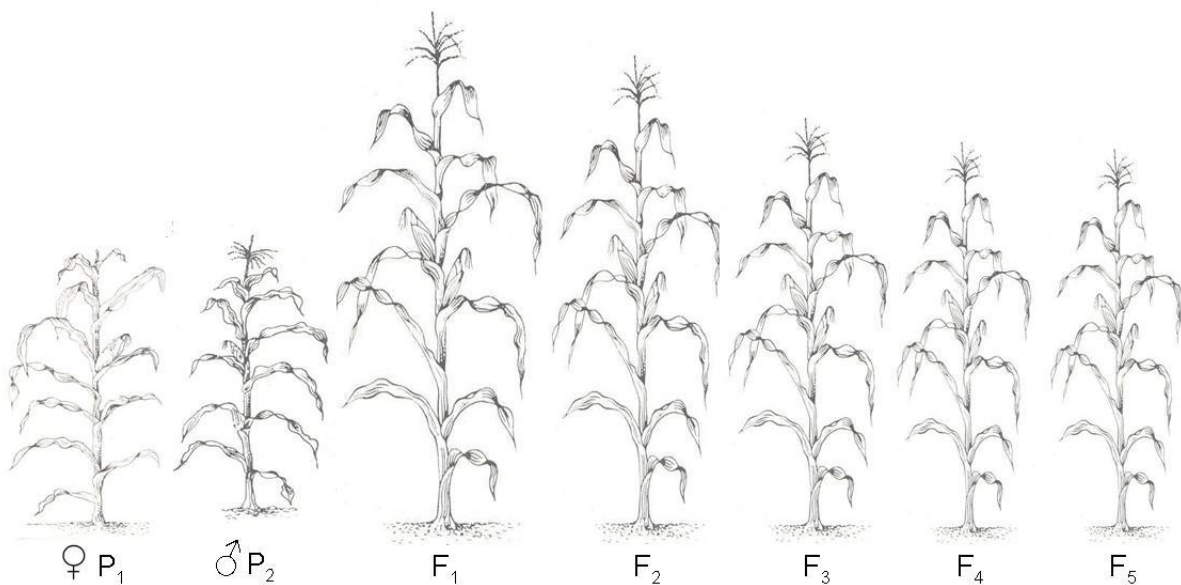
Hybridní odrůdy (osivo F_1 generace) vznikají kontrolovaným křížením 2–4 rodičovských komponent (inbredních linií) s vynikající kombinační schopností. Nejvyšší heterozní efekt je v F_1 generaci, v dalších generacích vzniklých volným opylením se snižuje (viz Obr. 10).

Udržování hybridní odrůdy = udržování rodičovských komponent samoopylováním nebo křížením uvnitř linie.

Kontrolované křížení se zajišťuje kastrací rostlin mateřské komponenty nebo pylovou sterilitou. U kukuřice se používá systém cytoplazmaticko-jaderné pylové sterility, cytoplazma se přenáší po matce, nutno přikřížit linii nesoucí gen obnovitele pylové fertility.

Postup tvorby hybridních odrůd:

1. vytvoření segregující populace (rekurentní selekce, zpětné křížení),
2. inbreeding vybraných rostlin, tvorba inbredních linií,
3. testování kombinační schopnosti linií (hodnocení výsledných hybridů na více lokalitách ve více letech),
4. zkoušení a registrace nejlepších hybridů.



Obr. 10 Schéma využití heterozního efektu

6.2 Výpočet a hodnocení GCA a SCA u hybridů

Úspěšnost hybridu závisí na kombinačních schopnostech rodičovských komponent. Výchozí materiál by měl mít velkou genetickou variabilitu a vysokou inbrední depresi (40 %). Pak je výnos hybridu ve srovnání s populací o 20–30 % vyšší.

Hodnocení kombinační schopnosti rodičovských linií:

- obecná kombinační schopnost GCA (General Combining Ability) – průměrná schopnost poskytnout v potomstvu heterozní efekt nebo transgresi při jakémkoliv křížení, souvisí s aditivním účinkem genů.
- specifická kombinační schopnost SCA (Specific Combining Ability) – schopnost poskytnout heterozní efekt jen v určité kombinaci linií, neaditivní, souvisí se superdominancí a interakcí mezi geny.

Existuje několik metod, jak stanovit kombinační schopnosti linií. Přesné odhady GSA i SCA lze zjistit na základě dialelního křížení zkoušených linií a testování výkonu vytvořených hybridních kombinací.

Pro výpočet budou použity údaje o výnosu potomstev z dialelního křížení zkoušených inbredních linií.

Výkon hybridu AB je dán vztahem:

$$Y_{AB} = \bar{x} + GCA_A + GCA_B + SCA_{AB}$$

\bar{x} = průměrná výkonnost všech testovaných hybridů

GCA_A = efekt obecné kombinační schopnosti linie A

GCA_B = efekt obecné kombinační schopnosti linie B

SCA_{AB} = efekt specifické kombinační schopnosti křížení linie A s linií B (hybrid AB)

GCA – průměrná hodnota F_1 hybridů určité rodičovské linie vyjádřená jako odchylka od celkového průměru všech hybridů v křížení. Výkon hybridu = suma GCA obou linií.

SCA – odchylka skutečné hodnoty od očekávané hodnoty hybridu.

$$\bar{x} = \frac{T}{n-1}$$

$$GCA_A = \frac{T_A}{2(n-1)} - \bar{x}$$

$$SCA_{AB} = AB - E(AB) \quad E(AB) = \bar{x} + GCA_A + GCA_B$$

T = součet hodnot všech hybridů

n = počet rodičovských linií

T_A = součet hodnot hybridů rodičovské linie A (otec i matka)

AB = skutečná hodnota hybrida AB

E(AB) = očekávaná hodnota hybrida AB

Příklad výpočtu obecné a specifické kombinační schopnosti linií A, B a C:

Průměrné výnosy jednotlivých hybridů z dialelního křížení mezi liniemi A, B a C

	♂ A	B	C	Σ
♀ A	–	13,3	12,1	25,38
B	14,2	–	13,6	27,87
C	13,1	12,6	–	25,66
Σ	27,34	25,87	25,71	78,91

$$n = 3$$

$$\bar{x} = \frac{T}{n-1} = \frac{78,91}{6} = 13,15$$

GCA pro linie:

$$GCA_A = \frac{T_A}{2(n-1)} - \bar{x} = \frac{(25,4 + 27,3)}{2(3-1)} - 13,15 = 0,03$$

$$GCA_B = 0,28$$

$$GCA_C = -0,31$$

SCA pro kombinace linií:

$$E(AB) = \bar{x} + GCA_A + GCA_B = 13,15 + 0,03 + 0,28 = 13,46$$

$$SCA_{AB} = AB - E(AB) = 13,3 - 13,46 = -0,16$$

$$SCA_{BA} = BA - E(BA) = 14,2 - 13,46 = 0,78$$

Tabulka vypočítaných hodnot GCA a SCA

SCA	♂ A	B	C	Σ	GCA
♀ A	–	-0,16	-0,79	-0,95	0,03
B	0,78	–	0,50	1,29	0,28
C	0,22	-0,56	–	-0,33	-0,31
Σ	1,01	-0,72	-0,29	0,00	0,00

Závěr: Na základě hodnot GCA a SCA je možné vybrat nejlepší rodičovské kombinace do hybridního křížení. Pro uvedený příklad to jsou linie A a B v kombinaci BA (B matka, A otec).

7 Využití poznatků a metod molekulární biologie ve šlechtění rostlin

Molekulárně-biologické metody jsou z historického hlediska nejmladší, současně však nejdynamičtěji se rozvíjející součástí metodologického aparátu současné teoretické i aplikované biologie. Možnost automatizace některých reakcí a metod (izolace nukleových kyselin, syntéza specifických fragmentů DNA, čtení nukleotidových sekvencí apod.) umožňuje rozšiřovat aplikaci molekulárních metod ve stále větším měřítku. Neustálé inovace postupů a zlepšující se cenová dostupnost potřebného přístrojového vybavení přináší zjednodušení a zlevnění odpovídajících technik, což umožňuje jejich rozšíření do nejrůznějších biologických oborů. Molekulární metody tak pronikly např. do ekologie, systematické a evoluční biologie, populační biologie, mikrobiologie, lékařství (zdravotnictví), fytopatologie a postupně také do šlechtění hospodářských zvířat a rostlin.

7.1 Přehled a stručné vysvětlení základních pojmů

Genetická informace rostlinných buněk je obsažena v molekulách DNA, organizovaných v chromozomech, a je součástí tří různých organel; jádra, chloroplastů a mitochondrií.

DNA je biologická makromolekula – polymer v podobě řetězce nukleotidů. Každý nukleotid má tři základní stavební součásti:

- **cukr – deoxyribóza**
- **fosfát** – vazebný zbytek kyseliny ortofosforečné, fosfátová skupina je můstek propojující 5' uhlík každé deoxyribózy s 3' uhlíkem předchozí deoxyribózy, výsledkem je tzv. cukr-fosfátová kostra DNA,
- **nukleová báze** – dusíkatá heterocyklická sloučenina.

V DNA se v různých kombinacích vyskytují především čtyři základní nukleové báze, dvě purinové (**adenin [A]** a **guanin [G]**) a dvě pyrimidinové (**tymin [T]** a **cytozin [C]**). Pořadí jednotlivých nukleotidů spojených v polynukleotidový řetězec, tzv. primární struktura DNA (obecně primární struktura nukleových kyselin), určuje genetickou informaci organismu.

Dvoušroubovici DNA tvoří dvě navzájem spletené šroubovice, každá mířící opačným směrem (jsou antiparalelní). Každé vlákno lineární molekuly má konec 5' a 3'. Toto označení vyplývá z číslování atomů uhlíku 2-deoxyribózy. Mezi protilehlými bázemi obou vláken se vytvářejí vodíkové vazby, a to mezi **guaninem a cytozinem** (tři) nebo mezi **adeninem a thyminem** (dvě) a tvoří tak komplementární páry. Komplementární párování pak umožňuje realizovat množení, přenos a přepis genetické informací během procesů replikace, transkripce a translace.

Přenos genetické informace

Přenos genetické informace z jedné buněčné generace do druhé (z mateřské buňky do dceřiných) je umožněn schopností **DNA se replikovat** (zdvojit) a tvořit dceřiné molekuly, které jsou předávány do dceřiných buněk při mitotickém nebo meiotickém dělení.

Replikace

Na počátku tohoto procesu dochází k rozvinutí a uvolnění jednotlivých řetězců dvoušroubovice DNA (zanikají vodíkové vazby mezi bázemi nukleotidových párů). Oba polynukleotidové řetězce slouží jako vzory (matrice), ke kterým se na základě komplementarity přiřazují volné nukleotidy. Jednotlivé nukleotidy se mezi sebou spojují vazbami a vytvoří nový polynukleotidový řetězec, jehož pořadí nukleotidů je komplementárně určeno pořadím nukleotidů v matricovém řetězci. Z původní molekuly DNA vznikají dvě dvouřetězcové dceřiné molekuly, ve kterých jeden řetězec pochází z původní mateřské molekuly DNA a druhý je nově vytvořený (semikonzervativní způsob replikace). Základním enzymem nutným pro replikaci DNA je DNA-polymeráza. DNA-polymeráza může syntetizovat nový řetězec DNA pouze za přítomnosti krátkých oligonukleotidů – primerů a vždy jen jedním směrem (5' → 3'). Vazba mezi nukleotidy (fosfodiesterová vazba) vzniká mezi koncovou -OH skupinou na 3' konci nově syntetizovaného DNA řetězce a fosfátovou skupinou na 5' konci volného nukleozid-trifosfátu.

Expres genů = vyjádření genetické informace proteosyntézou (syntézou bílkovin), tzn. vyjádření v primární struktuře bílkovin. Konkrétní informace uložená v genech je přenesena do konkrétních vlastností buňky. Zjednodušeně můžeme tento princip toku informací znázornit takto:



Tento jednosměrný tok genetické informace při genové expresi je označován za **centrální dogma molekulární biologie**. (Nověji bylo toto dogma rozšířeno o možnost reverzní transkripce RNA → cDNA a RNA → RNA.)

Proteosyntéza probíhá ve dvou stupních:

- 1) Nejdříve probíhá transkripce – informace z DNA se přepíše do mRNA, probíhá především v buněčném jádře, ale i v organelách, které obsahují DNA (např. mitochondrie).
- 2) Následuje translace – podle informace v mRNA se syntetizují bílkoviny, probíhá na ribozomech, pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci je určeno pořadím nukleotidů v molekule mRNA (genetický kód).

Struktura RNA

Ribonukleová kyselina je biopolymer tvořený ribonukleotidy, což jsou látky složené z nukleové báze (**adenin (A)**, **guanin (G)**, **cytozin (C)** nebo **uracil (U)**), pětiuhlíkatého monosacharidu **ribózy** a jednoho **zbytku kyseliny fosforečné**. První tři báze jsou totožné s těmi, které se nacházejí v DNA, ale thymin přítomný v DNA je nahrazen uracilem, který se od thyminu liší nepřítomností metylové skupiny. RNA je kvůli volné 2'-OH skupině výrazně reaktivnější, ale také nestabilnější než DNA, je mnohem citlivější k degradaci. Molekuly RNA tvoří většinou kratší obvykle jednořetězcová vlákna a jsou schopny vytvářet bohaté sekundární a terciární struktury.

Typy molekul RNA vstupujících do procesů genové exprese:

Mediátorová RNA (mRNA, messenger RNA) je přepisována podle sekvence DNA (u eukaryot je pak exportována do cytoplazmy) a využita pro překlad do proteinů. mRNA je nejdříve přepisována jako primární transkript (hnRNA), který často obsahuje nekódující oblasti – introny. Molekuly hnRNA prochází bezprostředně po syntéze posttranskripčními úpravami, jako je přidání poly(A) na 3' konce a tzv. čepičky (5' konec) nebo „splicing“ (vyštěpení intronů). Výsledná mRNA stále obsahuje část nepřekládané oblasti s regulačními funkcemi a kódující oblast tvořenou nepřekrývajícími se trojicemi nukleotidů – kodóny, podle kterých jsou připojovány příslušné aminokyseliny, start-kodón a stop-kodón určující začátek a konec transkripce.

Transferové RNA (tRNA) přináší aminokyseliny na ribozomy, připojují specifickou aminokyselinu do rostoucího polypeptidového řetězce při translaci a tak umožňují překlad informace z úrovně nukleových kyselin do úrovně proteinů. Molekuly tRNA tvoří specifickou strukturu „jetelového listu“. Tato struktura obsahuje tzv. smyčku antikodónu, která se skládá z trojice bází komplementárních ke kodónu dané aminokyseliny (AMK). Tato sekvence umožňuje při proteosyntéze zařazení komplexu AMK-tRNA na správné místo, přičemž samotné rozpoznání probíhá podle párování bází v dvojici kodón – antikodón. Na konci -CCA- 3' je navázána esterovou vazbou přenášená aminokyselina. Jedna tRNA je často schopna rozpoznávat více různých kodónů patřících jedné aminokyselině.

rRNA (ribosomální RNA) tvoří stavební složky ribosomálních podjednotek.

snRNA (*small nuclear RNA*) – malé jaderné RNA se podílejí na procesu tzv. „splicing“ sestřihu hnRNA, při kterém dochází k vyštěpení intronů.

Regulační typy RNA, jako např.:

mikroRNA – podílí se na regulaci genové exprese – jsou komplementární k určitým úsekům mRNA, váží se na ně a tím regulují jejich translaci,

malé interferující RNA (*small interfering RNA* – **siRNA**).

Transkripce

Transkripce je proces, při kterém dochází k „přepisu“ genetické informace z DNA do mRNA. Syntéza RNA probíhá v oblasti lokálního oddělení vláken dvoušroubovice DNA a pouze jedno vlákno DNA (tzv. nekódující řetězec 3→5) funguje jako templát pro syntézu RNA. K jednotlivým nukleotidům DNA (deoxyribonukleotidům) se na základě komplementarity přiřazují volné nukleotidy RNA (ribonukleotidy). Ty jsou spojeny vazbami a vytvoří souvislý polyribonukleotidový řetězec, který se prodlužuje a postupně se od molekuly DNA odděluje, opouští jádro a napojuje se na ribozomy. Pro průběh transkripce je nezbytné katalytické působení enzymu **RNA-polymerázy**.

Fáze transkripce:

1. navázání RNA-polymerázy na oblast DNA označovanou jako promotor a následná aktivace,
2. iniciace – rozvine se dvoušroubovice DNA, začne se syntetizovat RNA a RNA-polymeráza vystupuje z oblasti promotoru,
3. elongace – prodlužování řetězce,
4. terminace – ukončení transkripce a uvolnění molekuly mRNA; následuje několik posttranskripčních úprav.

Translace

Tímto termínem označujeme překlad informace ze struktury mRNA do primární struktury bílkovinného řetězce. Translace probíhá v cytoplazmě buňky na ribozomech. Aminokyseliny jsou na místo syntézy (do ribozomů) transportovány pomocí tRNA. Druh aminokyseliny určuje kodón (triplet) = tři za sebou následující báze v mRNA → ke každému kodónu je komplementární antikodón – tři za sebou následující báze v molekule tRNA komplementární ke kodónu (každá tRNA je specifická pro určitou aminokyselinu)

7.2 Struktura, funkce a uspořádání rostlinných genů – základní pojmy

Gen je základní jednotka genetické informace (základní jednotka dědičnosti). Je to určitý úsek DNA (sekvence nukleotidů) na chromozomu. Gen se může vyskytovat v různých formách – **alelách**. Pozice, kterou zaujímá gen na chromozómu, se nazývá **lokus**.

Rostlinné geny můžeme podle funkce rozdělit do dvou základních skupin:

1. **Strukturní geny** – kódují primární strukturu proteinů, jako jsou např. proteiny s biochemickou, fyziologickou nebo stavební funkcí.
2. **Geny pro funkční RNA** – jejich produkty, na rozdíl od strukturních genů, nepodléhají translaci. Jsou to zejména geny pro tRNA a rRNA.

Soubor všech alel v buňce (genetická výbava) daného jedince označujeme jako **genotyp**.

Soubor všech genů daného organismu nazýváme **genom**.

Sekvence jaderného genomu

1. Kódující – geny a genové rodiny.
2. Nekódující (introny, repetitivní sekvence a mobilní elementy).

Genofond (gene-pool) – geny dostupné pro zlepšování (šlechtění) daného druhu, které jsou k dispozici uvnitř tohoto druhu, nebo jsou odvozeny z jiných druhů, schopných vzájemného křížení.

Strukturní geny:

Eukaryotický gen se skládá z několika částí:

- promotor,
- zaváděcí sekvence,
- kódující sekvence
- a terminační sekvence.

Promotor je místo, na které nasedá RNA-polymeráza a tím zahajuje přepis genu. Leží ve směru 5- od transkripční oblasti. Sekvence promotoru nepodléhá transkripci, avšak rozhoduje o tom, kdy bude docházet k transkripci genu a s jakou intenzitou. Pro tuto funkce jsou důležité krátké specifické sekvenční úseky (boxy), společné všem promotorům (TATA, CAAT, případně AGGA). Dále se zde vyskytují specifické sekvenční úseky rozhodující o specifčnosti transkripce daného genu. Všechny tyto sekvenční úseky mají afinitu k regulačním proteinům (transkripčním faktorům), které migrují mezi cytoplazmou a jádrem nebo se trvale nacházejí v jádře. Tyto regulační proteiny se za určitých vnitřních (např. působení fytohormonů) nebo vnějších (např. vlivem abiotického stresu) podmínek vážou na specifické sekvence promotorů a tím aktivují transkripci daného genu.

Účinnost promotoru mohou zvyšovat zesilovače transkripce. Jsou to regulační oblasti, které mohou, ale nemusí sousedit s promotorem.

Zaváděcí sekvence je umístěna za promotorem a je již přepisována do RNA, ale nepřekládá se do struktury proteinu. Pak následuje kódující sekvence, která se zpravidla skládá z kódujících úseků (exonů), přerušovaných nekódujícími úseky (introny). Za ní následuje terminační sekvence, která spolurozhoduje o stabilitě mRNA.

Nekódující sekvence

Velká část rostlinného genomu je tvořena repetitivními sekvencemi mimo geny. Jsou to sekvence s vysokým množstvím kopií. Pokud jsou kopie sekvenčního motivu v blocích, v řadě za sebou, hovoříme o tandemových repetících, od nich odlišujeme repetitivní sekvence rozptýlené v genomu jako jednotlivé kopie (rozptýlené repetice).

Tandemové repetice:

- Satelity – satelitní DNA je hojná v oblasti centromer a konstitutivního heterochromatinu.
- Minisatelity (motiv 9 až 20 pb) jsou kratší tandemové repetice, které se více vyskytují v subtelomerických oblastech chromozomů.
- Mikrosatelity (STR – *short tandem repeats* nebo SSR – *simple sequence repeats*) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů (1 až 6 pb), např. (A)_n, (AG)_n, (GATA)_n. Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 bp. Mikrosatelity jsou součástí nekódujících sekvencí genomu. Postupné poznávání mikrosatelitních sekvencí vedlo k vyvinutí postupu pro rychlou detekci jejich polymorfizmu. Toho lze využít při genetickém mapování nebo selekci (mikrosatelitní markery).

Rozptýlené repetice:

- transpozony, retrotranspozony

7.3 Základní principy metod využívaných v molekulární genetice rostlin

Restrikční štěpení a klonování do plazmidů

Restrikční enzymy a plazmidy umožňují začlenit a namnožit specifický úsek DNA a přenést ho do jiného organismu. (Plazmid plní funkci vektoru).

Hybridizace

Teplotní denaturace a opětná renaturace DNA v přítomnosti značené DNA sondy

Využití: „Southernova“ hybridizace

In situ hybridizace (např. lokalizace sekvencí na chromozómech)

DNA čipy

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) simuluje v *in vitro* podmínkách proces replikace. Při iniciaci replikace (*in vivo*) vznikají pomocí složitého enzymatického komplexu jednovláknové úseky matricové (templátové) DNA. V *in vitro* podmínkách nahrazuje tento proces teplotní denaturace. Výchozí množství templátové DNA, může být velice nízké. Dochází k zmnožení (amplifikaci) určitého specifického úseku DNA (ze 2 vláken DNA získáme po 30 cyklech teoreticky celkem $2^{30} = 107\,370\,000$ kopií tj. 107 milionů kopií). Požadovaný úsek musí být ohraničen známými sekvencemi, které jsou komplementární ke dvěma krátkým oligonukleotidů (tzv. primerům). Princip je založen na schopnosti termostabilní DNA-polymerázy syntetizovat podle templátu nové vlákno DNA (směr reakce $5' \rightarrow 3'$) v podmínkách mnohonásobného cyklického střídání tří reakčních teplot.

Složky reakce:

Templátová DNA – studovaná DNA nebo její část, kterou chceme namnožit (gen, část genu nebo nekódující sekvence).

Taq DNA-polymeráza – termostabilní enzym, který katalyzuje syntézu nového řetězce DNA podle templátu.

PCR pufr – udržuje stabilní pH a obsahuje chemikálie pro optimální aktivitu a stabilitu DNA-polymerázy.

MgCl₂ – Mg²⁺ ionty slouží jako kofaktor DNA polymerázy

Nukleotidy (dNTP) – směs deoxynukleosid trifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), základních stavebních jednotek DNA

Primery – krátké oligonukleotidy (DNA), párující se s komplementárními sekvencemi v templátové DNA a sloužící jako počáteční místo replikace DNA, bez kterého by DNA-polymeráza nemohla začít syntézu nového řetězce. K prodlužování sekvence za primerem dochází ve směru $5' \rightarrow 3'$ nově vznikajícího vlákna.

Vlastnosti primerů:

- Délka je obvykle 18-28 pb.
- Primery musejí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měly by být pokud možno zcela komplementární k úseku, na který mají dosedat (nasedání primerů musí být bezchybné alespoň v 3' oblasti primeru).

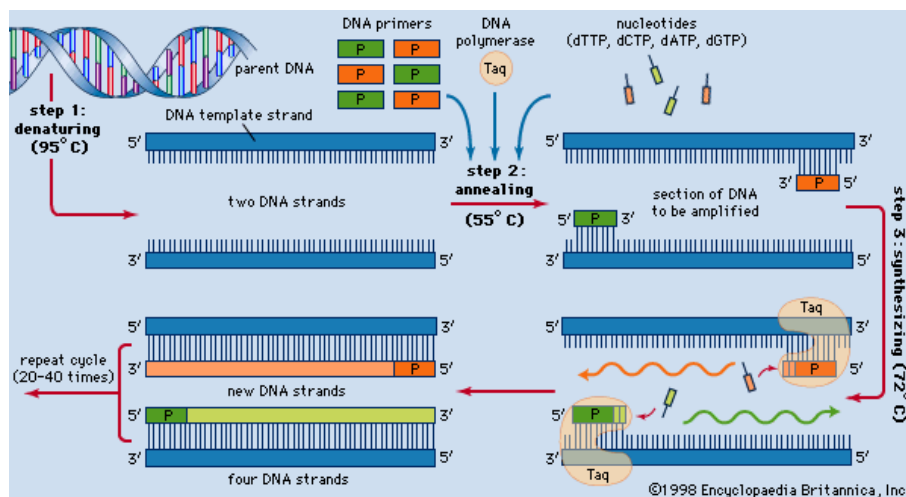
- Primery by spolu neměly být vzájemně komplementární, jinak se samy začnou chovat jako templáty a během PCR se budou tvořit jejich dimery (to platí zvláště o jejich 3'-koncích).
- Primer by neměl obsahovat vnitřně komplementární sekvence, aby nedocházelo k vnitřní hybridizaci (tvorbě „smyček“).
- Rozložení AT a CG párů by mělo být pokud možno rovnoměrné, zejména 3'-konec by neměl být příliš bohatý na CG.
- Teploty, při kterých dosedají oba použité primery, by se neměly výrazně lišit (teplota tání primerů by měla být alespoň 50 °C).
- Teplota tání obou primerů by měla být podobná.

Pro standardní PCR využíváme vždy pár primerů – tzv. „forward“ primer a „reverse“ primer. Primery se vždy navrhují podle sekvence horního vlákna, tj. sekvence, která se při běžném zápisu DNA používá. Sekvence „forward“ primeru je totožná se sekvencí horního vlákna (5→3). „Forward“ primer umožňuje syntézu horního vlákna podle templátového spodního vlákna (3→5). „Reverse“ primer se navrhuje jako komplementární sekvence k hornímu vláknu (5→3), která je navíc v reverzní orientaci. „Reverse“ primer umožňuje syntézu dolního vlákna podle templátového horního vlákna (5→3).

Jednotlivé kroky PCR:

- 1. Denaturace** – DNA se po dobu 20 – 30 sekund zahřívá na teplotu 93–94 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.
- 2. Nasednutí primerů** (*annealing*) – teplota se sníží na 50–65 °C (závisí na T_m primerů), což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže *Taq* DNA-polymeráza.
- 3. Prodlužování** – teplota v této fázi závisí na použité DNA-polymeráze. Nejběžnější *Taq* DNA-polymeráza má optimum aktivity na 72°C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Nové vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA je syntetizováno ve směru od 5' →3' (na 3' konci „přirůstá“).

Kroky se cyklicky opakují a pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů (Obr. 11). PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek °C.



Obr. 11 Schéma polymerázové řetězové reakce (PCR)

qPCR (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*) je metoda založená na klasické PCR s tím rozdílem, že speciální termocykler umožňuje kontinuálně monitorovat (v reálném čase) přírůstky DNA během každého cyklu (u klasické PCR se detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA. Úroveň detekované fluorescence, která v průběhu PCR roste, je přímo úměrná množství nově syntetizované nukleové kyseliny (vzniklého produktu). Přístroj po každém cyklu změří fluorescenci a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně množství uvolněné fluorescence. Primárním výstupem jsou hodnoty C_T (*threshold cycle*), které jsou definovány jako číslo cyklu, ve kterém emise fluorescence překročila prahovou hodnotu (*threshold*). Čím nižší je hodnota C_T , tím více kopií sledovaného genu je přítomno ve vzorku.

Nejčastěji používané typy fluorescence:

- barvivo interkalující s dvouřetězcovou DNA (např. SYBR® Green),
- hydrolýza specifické fluorescenční sondy vázající se ke střední části amplifikovaného produktu (např. TaqMan, Molekulární majáky, QZyme),
- fluorescenčně značené sondy nebo primery (FRET, Scorpions),

Vyhodnocení reakce (vlastní kvantifikace)

Absolutní kvantifikace – neznámá koncentrace cílové DNA ve vzorcích se vypočítá s pomocí kalibrační křivky, která je vytvořena ze vzorků se známou koncentrací specifické DNA.

Relativní kvantifikace – zjišťuje změny v množství mRNA určitého genu ve skupině vzorků a vyjadřuje ji jako relativní poměr k množství RNA vnitřní kontroly. Tento referenční gen je často tzv. „housekeeping“ gen, jehož cDNA je amplifikována společně se stanovovaným genem. Pro spočítání exprese cílového genu ve vztahu k odpovídajícímu referenčnímu genu (genům) je možné použít několik metod. Výpočty jsou založeny na srovnávání C_T , při dosažení stejné úrovně fluorescence a mohou být prováděny pomocí dvou základních modelů:

- model bez korekce efektivity, tzv. **komparativní delta-delta metodu**.
- model s korekcí efektivity, nazývaný **Pfafflova metoda**.

Podrobnější informace o této metodě jsou uvedeny v kap. 7. 8.

7.4 Využití metod molekulární genetiky ve šlechtitelské praxi

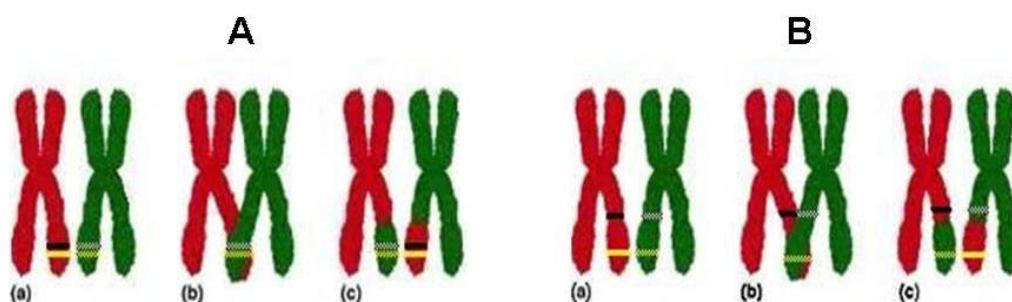
- identifikace specifických alel, detekce konkrétních sekvencí (identifikace GMO):
 - alely genů pro subjednotky gluteinů - pekařská kvalita,
 - alely *PPD* a *VRN* genů – reakce na fotoperiodu a vernalizační požadavek,
- identifikace genotypů (odrůd, linií):
 - hodnocení vyrovnanosti a stálosti linií v pozdní fázi šlechtění,
 - ověření odrůdové pravosti a čistoty,
- fylogenetické analýzy,
- genetické mapování,
- MAS (*marker assisted selection*),
- odlišení heterozygotů,
- rozšíření variability – geneticky modifikované organismy (GMO) – přenos, stabilní integrace a exprese určitých genů do kulturních rostlin.

V současné době jsou převážně využívány markery rezistence k chorobám a škůdcům. Tyto markery umožní předběžnou selekci genotypů získaných z křížení konkrétních rodičovských genotypů. Vybrané rostliny z potomstev jsou charakterizovány pomocí DNA markerů a genotypy nevykazující signál jsou vyřazeny. Tím se zúží výběrová základna již na počátku šlechtitelského procesu ve prospěch jedinců s vhodným genetickým podkladem pro cílový fenotyp.

Kodominantní markery umožňují odlišit homozygoty od heterozygotů. Kmenové matky s dominantním projevem znaku není nutné testovat v příštím roce, aby se vyloučily heterozygotní genotypy. To přináší urychlení selekce na dominantní znak.

Selekční markery

Jsou to znaky, které se dědí společně s selektovanými znaky, protože leží na stejných chromozomech v těsné blízkosti genů nebo QTL odpovědných za dané selektované znaky (Obr. 12). Na rozdíl od selektovaných znaků jsou markery snadno identifikovatelné.



Obr. 12 Příklady silné genetické vazby mezi alelami znaku a markéru - A a slabé genetické vazby – B, která vedla k rozpadu vazby během crossing-overu; (a) původní rodičovské chromozomy, (b) mechanismus crossing-overu a (c) rekombinantní chromozómy

Typy selekčních markerů:

- morfologicko anatomické (barva květu pelušky/ hrachu; červená barva révy chmele souvisí s jemně aromatickou kvalitou hlávek),
- biochemicko-fyziologické markery (selekční geny u transgenních rostlin),
- biochemicko-genetické markery (zásobní proteiny a izoenzymy),
- DNA markery.

Požadavky na DNA markery:

- těsná genetická vazba s selektovaným genem (5-10 cM) prokázaná alespoň ve dvou nezávislých kříženích (čím je vzdálenost mezi sekvencí markeru a sekvencí selektovaného genu menší, tím je menší riziko možného crossing-overu, který by mohl mít za následek rozpad vazby),
- snadná identifikovatelnost,
- kodominantní charakter,
- vysoká četnost výskytu,
- polymorfismus,
- reprodukovatelnost, možnost automatizovat proces analýzy, finanční nenáročnost.

Typy DNA markerů:

- **založené na hybridizační analýze** celého genomu (RFLP),
- **založené na PCR** (hodnotí se údaje o pořadí nukleotidů (sekvence) nebo délkový polymorfismus):
 - analýza celého genomu: (např. **RAPD**, **AFLP**, **ISSR**),
 - analýza konkrétních částí genomu:
 - hodnotí se délkový polymorfismus sekvencí známých mikrosatelitů (**SSRs** – *Simple Sequence Repeats*) nebo se u amplifikovaných fragmentů hodnotí délkový polymorfismus po štěpení restriktivní endonukleázou (**CAPS** – *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), detekované rozdíly jsou u tohoto typu markeru výsledkem mutací v cílových místech štěpení příslušného enzymu,
 - hodnotí se polymorfismus sekvencí mezi jednotlivými retrotranspozony (**IRAP** – *inter-retrotransposon amplified polymorphism*) nebo mezi retrotraspozony a mikrosatelity **REMAP** (*retrotrasposon-microsatellite amplified polymorphism*), u obou metod jsou primery cíleny do hraničních sekvencí retrotranspozonů nebo mikrosatelitů,
- **založené na sekvencování:**
 - celogenomové markery – SNP (single nucleotide polymorphism).

7.5 Detekce alel genu *RHT8* pomocí mikrosatelitního markeru u pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)

Protokol 1

Náplň blokového cvičení:

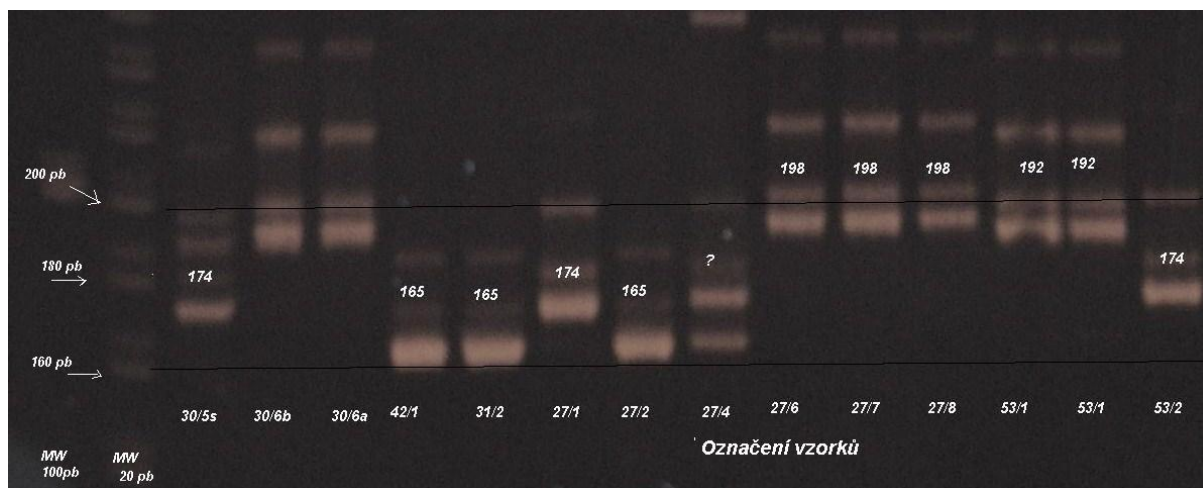
- poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu,
- úvod do řešené problematiky,
- požadavky na přístrojové vybavení,
- použité chemikálie a plast,
- izolace DNA,
- PCR,
- vertikální polyakrylamidová elektroforéza,
- vizualizace produktů PCR,
- zhodnocení výsledků laboratorního cvičení.

Poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu – viz příloha Provozní řád laboratoře.

Úvod do řešené problematiky

Při šlechtění obilnin je kladen velký důraz na délku stébla, což je znak úzce související s citlivostí k poléhání. Moderní odrůdy se vyznačují kratším stéblem. U pšenice je tento kvantitativní znak ovlivněn *RHT* geny (*RHT8*, *RHT-B1B* a *RHT-D1b*). Pro rychlou a přesnou detekci těchto genů byly vyvinuty SSR a STS (sekvenčně specifická místa) molekulární markery.

Pro detekci genu *RHT8* je používán mikrosatelitní marker *Xgwm261*. Vzdálenost *Xgwm261* od *RHT8* se udává 0,6cM. Tento mikrosatelitní marker má více alel (162–198 pb), ale s redukcí výšky je spojována pouze přítomnost alely 192 pb. Uvedené rozdíly ve velikosti alel je možno hodnotit na 7,5% akrylamidovém gelu (příklad viz Obr. 13).



Obr. 13 Příklad vyhodnocení velikosti alel markeru *Xgwm261* na 7,5% akrylamidovém gelu; čísla ve spodním řádku označují hodnocené genotypy; čísla ve sloupečcích nad proužky označují molekulové hmotnosti produktů v pb

Cíl: Za pomoci mikrosatelitního markeru *Xgwm261*. zjistit, zda testované genotypy nesou alelu zakrslosti genu *Rht8*.

Požadavky na materiál, chemikálie a technické vybavení laboratoře

Rostlinný materiál:

- 2 odrůdy pšenice ozimé,
- listy pšenice (odběr z mladých rostlinek ve fázi 2 listů).

Požadavky na přístrojové vybavení:

- nádoba na tekutý dusík,
- třecí misky s tloučkem,
- pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a kompatibilní špičky,
- centrifuga s otáčkami min. 10 000 rpm,
- termoblok,
- vortex,
- spektrofotometr,
- vertikální elektroforéza,
- zdroj stejnosměrného proudu,
- UV-transluminátor,
- digitální fotoaparát, kamera nebo celý fotodokumentační systém,
- mrazicí box (-20 °C).

Spotřební materiál:

- mikrokumavky PCR 1,5 ml,
- PCR zkumavky 0,5 ml,
- papírové ubrousky a filtrační papír,
- rukavice.

Kity, chemikálie a použité pufrы:

- DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen),
- Taq PCR Core Kit (Qiagen),
- specifické primery (20mM) F: 5' CTCCCTGTACGCCTAAGGC 3'
R: 5' CTCGCGCTACTAGCCATTG 3'
- absolutně čistý etanol (96%),
- sterilní destilovaná H₂O,
- akrylamid,
- bisakrylamid,
- temed,
- 10% persíran amonný,
- standardy molekulových hmotností: PCR Low Ladder Set (100 pb, 20 pb) (Sigma),
- fluorescenční barvivo: GelRed nebo Midori Green,
- TBE pufr: 89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA;

Elektroforetický pufr – TBE (10x koncentrovaný zásobní roztok):

55 g kyselina boritá,
108 g Tris,
9,3 g EDTA,
doplnit do 1 l destilovanou vodou.

Akrylamidový (AA) zásobní roztok (19:1) – 30 %:

15 g akrylamid,
0,79 g bisakrylamid,
50 ml H₂O,
Přefiltrovat a uschovat při 4 °C,

10x Loading Buffer (TaKaRa)

Postup při provádění jednotlivých metod

Izolace DNA

DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)

Před vlastní izolací nutno připravit:

- před prvním použitím kitu doplnit pufr AW a AP/E 96% etanolem,
- předehřát termoblok na 65 °C,
- předehřát pufr AE na 65 °C,
- zahřát pufr AP1, jestliže se při skladování vysrážel,
- připravit tekutý N₂.

Postup izolace:

1. Rozdrtit 100 mg listové tkáně v kapalném N₂ ve vychlazené třecí misce.
2. Prášek přenést do mikrozkušavky, přidat 400 μl AP1 a 4 μl RNase A (100 mg/ml), silně vortexovat.
3. Inkubovat 10 min při 65 °C (během inkubace 2x promíchat) – probíhá rozpad buněk.
4. Přidat 130 μl AP2, promíchat převrácením mikrozkušavky, inkubovat 5 min na ledu (v tomto kroku se srážejí bílkoviny a polysacharidy).
5. Centrifugovat 5 min max. rychlostí.
6. Přenést supernatant do fialové kolonky, umístěné v mikrozkušavce, centrifugovat 2 min max. rychlostí.
7. Opatrně přenést vodní fázi (nenabrat případný sediment) do nové zkušavky, přidat 1.5 V AP3/E a okamžitě promíchat převrácením mikrozkušavky.
8. Nanést 650 μl směsi z předcházejícího kroku (včetně sraženiny, jestliže se nějaká vytvořila) na bílou kolonku umístěnou ve 2 μl mikrozkušavce.
9. Centrifugovat 1 min 10000 rpm. Proteklá fáze se vylíje.
10. Opakovat bod 8) se zbylým vzorkem.
11. Na kolonku v nové zkušavce nanést 500 μl AW, centrifugovat 1 min při 10 000 rpm. Proteklá fáze se vylíje.
12. Na kolonku nanést 500 μl AW, centrifugovat 2 min při max. rychlosti.
13. Vysušit dokonale kolonku – centrifugovat 1 min při max. rychlosti.
14. Přenést kolonku do čisté mikrozkušavky, na kolonku nanést 100 μl předehřátého AE, inkubovat 5 min při pokojové teplotě a centrifugovat 1 min 10000 rpm.

Měření koncentrace DNA

Roztok DNA se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci DNA, absorbance při 280 nm odráží čistotu DNA, tj. míru přítomnosti proteinů. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo 1,8; u RNA je to okolo 2. Pokud je hodnota poměru výrazně nižší, než uvedené hodnoty, je DNA kontaminována proteiny.

PCR

- Příprava a rozmražení potřebných chemikálií na ledu (DNA, součásti reakční směsi (viz Tab. 1). Po celou dobu udržujeme všechny složky reakce na ledu.
- Popis zkumavek (datum a zkratka odrůdy, 0 – negativní kontrola)

Označení zkumavek:

1. zkumavka obsahující DNA genotypu č. 1
2. zkumavka obsahující DNA genotypu č. 2
3. zkumavka neobsahující DNA, ale deionizovanou vodu → negativní kontrola

Tab. 1 Přehled a označení vzorků

Zkumavka	Genotyp (DNA)	Vaše označení zkumavky
1		
2		
3	Negativní kontrola bez DNA	

Vlastní postup provedení PCR:

- a) Chemikálie (objemy na 4 vzorky) přidáváme postupně do nové mikrozkušavky dle Tab. 2. Tím si připravíme tzv. „premix“.
- b) Reakční směs promícháme pipetováním a následně krátce stočíme (6000 rpm).
- c) Do každé připravené zkumavky pipetujeme 10 µl reakční směsi.
- d) Do zkumavek přidáme 1 µl DNA nebo 1 µl vody v případě negativní kontroly.
- e) Promícháme a stočíme v centrifuze po dobu 15 sekund (6000 rpm).
- f) Pečlivě uzavřené zkumavky vložíme do termocykleru na požadovaný program.

Tab. 2 Složení reakční směsi (premixu)

Složky reakce	H ₂ O	Cl*	Q	dNTP	Primer F	Primer R	Taq polymeráza	Celkový objem (μl)
Koncentrace zásobních roztoků		10x konc	5x konc	10mM	20μM	20μM	5 U/ μl	
Objemy na 1 vzorek (μl)	4,55	1,25	2,50	0,25	0,30	0,30	0,10	9,25
** Objemy na 4 vzorky (μl)	18,20	5,00	10,00	1,00	1,20	1,20	0,40	37,00

*Pufir Cl obsahuje již barvicí látku, proto není třeba při pipetování na gel přidávat do vzorku barvičku.

**Reakční směs připravujeme v počtu o jeden vyšší (na každých 10 vzorků), než je počet zkumavek (vzorků), z důvodů pokrytí ztrát při pipetování.

Tab. 3 Teplotní podmínky reakce

Počáteční denaturace	94 °C	3 min	1x
Denaturace	94 °C	1 min	30x
Navázání primerů	56 °C	1 min	
Syntéza DNA	72 °C	1 min	
Závěrečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1x

Vzorky po PCR uchováme v lednici (do 24 hod) nebo v mrazicím boxu na -20 °C.

Vertikální polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

Pozor, akrylamid je toxický! Může být karcinogenní, mutagenní a teratogenní. Je zdraví škodlivý při vdechování a při styku s kůží. Je toxický při požití. Dráždí oči a kůži. Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží (R věty: R 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62).

Postup při PAGE:

- Připravíme si dvě skleněné destičky (jedna plochá destička a jedna skleněná destička s rozpěrkami o výšce 1 mm). Skleněné destičky vyčistíme etanolem.
- Skleněné destičky přiložíme na sebe, aby spodní okraj byl dokonale rovnoběžný s rozpěrkami.
- Skleněné destičky vložíme do stojánku s gelovou podložkou. Stojánek obsahuje tlakové tyče, které rovnoměrně rozdělují tlak přenášený z utahovacích šroubů, čímž je zaručené úplné utěsnění.

- d) Stojánek s upevněnými skleněnými destičkami položíme na lici základnu a upevníme kolíky otočením o 180°.
- e) Připravíme si 30 ml 7,5% gelu do odměrného válce (na 50 ml); roztok se skládá z následujících komponent uvedených v následující tabulce (Tab. 4).

Tab. 4 Složení akrylamidového gelu 7,5%

AA/BIS 30% (19:1)	7,5 ml
TBE 10%	3 ml
Destilovaná H ₂ O	doplníme do 30 ml
TEMED	49,8 μl
10% persíran amonný	210 μl

- f) Roztok v odměrném válci okamžitě promícháme a nalijeme do připravených skel, vložíme hřeben s příslušným počtem jamek a necháme roztok polymerizovat nejméně 30 minut.
- g) Do hlavní nádrže vertikální gelové elektroforézy přeneseme vnitřní modul se skleněnými destičkami a celý vnitřní prostor zalijeme 1x TBE, vnější prostor hlavní nádrže zalijeme cca do jedné čtvrtiny, aby byla ponořena spodní část vnitřního modulu. Pipetujeme od každého vzorku 8 μl do jednotlivých jamek. Do krajních jamek nakonec nanese markery molekulových hmotností (100 pb, 20 pb), které slouží k určení velikosti jednotlivých produktů.
- h) Příprava markerů molekulových hmotností:
- 5 μl H₂O + 1,5 μl markeru molekulových hmotností (100 pb) + 0,8 μl barvičky (10x *Loading Buffer*),
 - 5 μl H₂O + 1,5 μl markeru molekulových hmotností (20 pb) + 0,8 μl barvičky (10x *Loading Buffer*).
- i) Všechny ostatní nepoužité jamky naplníme 1x TBE pufrem.
- j) Hlavní nádrž překryjeme víkem a připojíme k elektrickému zdroji a spustíme elektroforézu při konstantním proudu nejprve 10 min 10mA a poté asi 3,5 hod při 25 mA.

Barvení PAGE

Polyakrylamidový gel přeneseme do roztoku 1 x TBE, přidáme 8 μl barvicí látky RED GEL a necháme protřepávat na třepačce cca 15 minut. Gel omyjeme destilovanou vodou, umístíme na prosvětlenou plochu UV-transluminátoru a zdokumentujeme fotoaparátem.

Výsledky a závěr

U genotypu 1 byl detekován PCR produkt o velikosti pb. Hodnocený genotyp je/není nositelem alely zakrslosti genu *RHT8*.

U genotypu 2 byl detekován PCR produkt o velikosti pb. Hodnocený genotyp je/není nositelem alely zakrslosti genu *RHT8*.

7.6 Detekce polymorfismu v oblasti QTL na chromosomu 6H spojovaného s odolností vůči suchu u ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.)

Protokol 2

Náplň blokového cvičení:

- poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu,
- úvod do řešené problematiky,
- požadavky na přístrojové vybavení.
- použité chemikálie a plast,
- izolace DNA,
- PCR,
- horizontální agarózová elektroforéza,
- zhodnocení výsledku laboratorního cvičení.

Poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu – viz příloha Provozní řád laboratoře

Úvod do řešené problematiky

Odolnost vůči suchu je polygenně založený komplex znaků, který zahrnuje celou řadu morfofyziologických a biochemických adaptací zaměřených nejen na přežití rostlin v podmínkách vodního deficitu, ale v případě hospodářských plodin i na získání co největšího výnosu nebo nejmenšího snížení výnosu v podmínkách sucha. Genetické faktory odpovědné za část těchto fenotypových znaků se označují QTL (Quantitative Trait Loci). Jsou to oblasti na chromozomech, které průkazně ovlivňují hodnoty kvantitativních znaků v rámci mapujících populací. Základní možnosti hodnocení spočívají v detekci QTL pro tyto znaky pomocí MAS, která využívá např. SSR, CAPS nebo RAPD markery mapované ve vazbě s těmito lokusy. Tato metoda má však v praktickém šlechtění (selekcce tolerantních genotypů) jen **omezené použití**. Pro genetické mapování se používají rodiče s co největším kontrastním projevem hledaného znaku bez ohledu na ostatní výnosové a kvalitativní parametry, zatímco

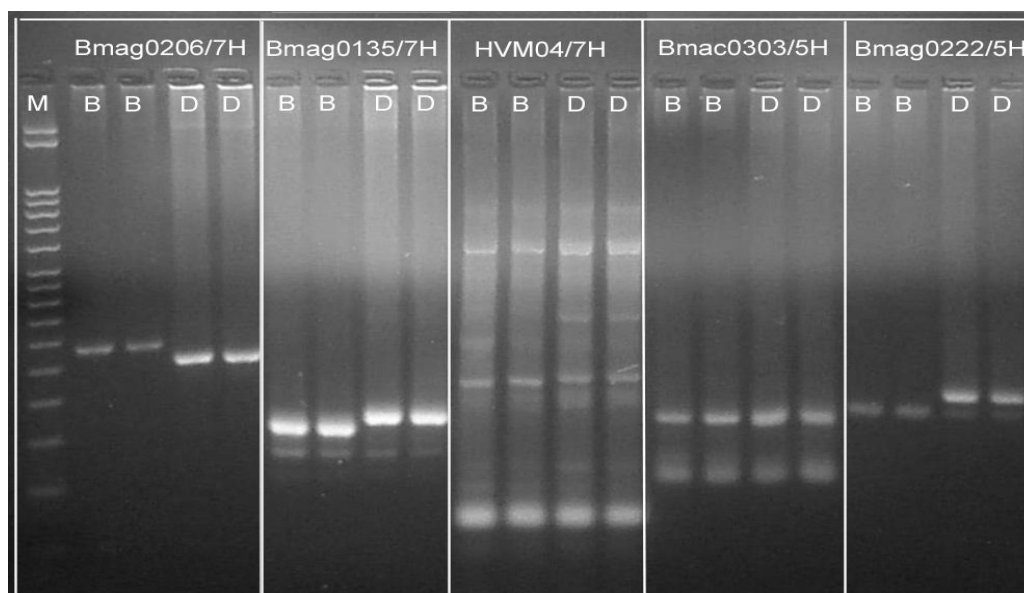
do komerčních šlechtitelských programů se křížení s tolerantními, ale nevýnosnými genotypy nezařazuje. Kromě toho odolnost vůči suchu je dána více QTL na různých chromozomech, proto by hodnocení genotypů na základě jednoho QTL (1 markérem) bylo neefektivní.

Polymorfismus mikrosatelitní DNA je dán rozdílným počtem opakování základního motivu a tento délkový polymorfismus může být relativně snadno detekovatelný. Při hodnocení polymorfismu odrůd jarního ječmene Tadmor a Jersey byly v oblasti dlouhého raménka chromozomu 6H nalezeny u relativně odolnější odrůdy Tadmor odlišné alely dvou mikrosatelitních markerů v blízkosti QTL spojovaného s odolností vůči suchu (Tab. 1). Lokalizace obou markerů v blízkosti tohoto QTL byla potvrzena ve třech nezávislých kříženích, i když přesná vzdálenost (v cM) nebyla publikovaná. Hodnocení polymorfismu může být provedeno na agarozových nebo akrylamidových gelech (viz Obr. 14).

Tab. 1 Seznam vybraných mikrosatelitních sekvencí polymorfních mezi odrůdami Tadmor a Jersey

Označení mikrosatelitu	Chromozóm	Detekce
Bmag0613***	6H	Agarozový gel
EBmac0602***	6H	Agarózový gel

*** prokázaná genetická vazba s geny nebo QTL spojovanými s tolerancí vůči suchu potvrzená v několika nezávislých kříženích



Obr. 14 Příklad hodnocení polymorfismu 5 mikrosatelitních markerů u 2 genotypů B a D

Cíl: Za pomoci SSR markeru EBmac0602 zjistit, zda testované genotypy nesou v oblasti dlouhého raménka chromozómu 6H alelu rodiče vykazujícího vyšší odolnosti vůči suchu.

Požadavky na materiál, chemikálie a technické vybavení laboratoře

Rostlinný materiál:

- rostliny 2 rodičovských odrůd (Tadmor, Jersey) a 2 rostliny z F₅ potomstva křížení těchto odrůd,
- listy pšenice (odběr z mladých rostlinek ve fázi 2 listů).

Požadavky na přístrojové vybavení:

- nádoba na tekutý dusík (Cryometal KB 20),
- třecí misky s tloučkem,
- pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a kompatibilní špičky,
- centrifuga s otáčkami min 10 000 rpm,
- termoblok,
- vortex,
- spektrofotometr,
- horizontální elektroforéza,
- zdroj stejnosměrného proudu,
- UV-transluminátor,
- digitální fotoaparát, kamera nebo celý fotodokumentační systém,
- mrazicí box (-20 °C).

Spotřební materiál:

- mikrokumavky PCR 1,5 ml,
- PCR zkumavky 0,5 ml,
- papírové ubrousky a filtrační papír,
- rukavice.

Kity, chemikálie a použité pufry:

- DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen),
- Taq PCR Core Kit (Qiagen),
- specifické primery (20mM) F: 5' GATTGGAGCTTCGGATCAC 3'
R: 5' CCGTCTAGGGAGAGGTTCTC 3'
- absolutně čistý etanol (96%),
- sterilní destilovaná H₂O,
- agaróza,
- standard molekulových hmotností: 100 bp DNA Ladder (Invitrogen,),
- fluorescenční barvivo: GelRed nebo Midori Green,
- TBE pufr: 89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA.

Elektroforetický pufr – TBE (10x koncentrovaný zásobní roztok):

55 g kyselina boritá,
108 g Tris,
9,3 g EDTA,
doplnit do 1 l destilovanou vodou.

Postup při provádění jednotlivých metod

Izolace DNA

Izolaci DNA provádíme pomocí kitu DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) podle doporučeného firemního protokolu (podrobný postup viz Protokol 1, kap. 7. 5. 3).

Měření koncentrace DNA

Roztok DNA se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci DNA, absorbance při 280 nm odráží čistotu DNA, tj. míru přítomnosti proteinů. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo 1,8; u RNA je to okolo 2. Pokud je hodnota poměru výrazně nižší než uvedené hodnoty, je DNA kontaminována proteiny.

PCR

- příprava a rozmražení potřebných chemikálií na ledu (DNA, součástí reakční směsi)
Po celou dobu udržujeme všechny složky reakce na ledu.

- popis zkumavek (datum a zkratka odrůdy, 0 – negativní kontrola)

Název rodičovského genotypu A

Název rodičovského genotypu B

Počet zkumavek: 5

1. zkumavka obsahující DNA rodičovský genotypu A.
2. zkumavka obsahující DNA rodičovský genotypu B.
3. zkumavka obsahující DNA rostliny 1 z potomstva(A x B).
4. zkumavka obsahující DNA rostliny 2 z potomstva (A x B).
5. zkumavka neobsahující DNA, ale vodu → negativní kontrola.

Vlastní postup provedení PCR

- a) Chemikálie (objemy na 6 vzorků) přidáváme postupně do nové mikrozkušavky podle tabulky 2. (Příprava reakční směsi – premixu).

Tab. 2 Složení reakční směsi (premixu)

Složky reakce	H ₂ O	Cl*	Q	dNTP	Primer F	Primer R	Taq polymeráza	Celkový objem (μl)
Koncentrace zásobních roztoků		10x konc	5x konc	10 mM	20 μM	20 μM	5 U/ μl	
Objemy na 1 vzorek (μl)	4,55	1,25	2,50	0,25	0,30	0,30	0,10	9,25
** Objemy na 6 vzorků (μl)	27,30	7,50	15	1,50	1,80	1,80	0,60	55,50

*Pufr Cl obsahuje již barvicí látku, proto není třeba při pipetování na gel přidávat do vzorku barvičku.

** Reakční směs připravujeme v počtu o jeden vyšší (na každých 10 vzorků), než je počet zkumavek (vzorků), z důvodů pokrytí ztrát při pipetování.

- b) Reakční směs promícháme pipetováním a následně krátce stočíme (6000 rpm).
- c) Do každé připravené zkumavky pipetujeme 10 μl reakční směsi.
- d) Do zkumavek přidáme 1 μl DNA nebo 1 μl vody v případě negativní kontroly.
- e) Promícháme a stočíme v centrifuze po dobu 15 s (6000 rpm).

- f) Pečlivě uzavřené zkumavky vložíme do termocykleru na požadovaný program (Tab. 3)

Tab. 3 Teplotní podmínky reakce

Počáteční denaturace	94 °C	3 min	1x
Denaturace	94 °C	30 s	30x
Navázání primerů	58 °C	30 s	
Syntéza DNA	72 °C	30 s	
Závěrečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1x
Chlazení	4 °C	24 h	1x

Horizontální elektroforéza ve 2% agarózovém gelu

- V mikrovlnné troubě rozvaříme 2,2 g agarózy v 110 ml pufru 1 x TBE. Po vychlazení na 60°C přidáme 5 µl barvičky GelRed (nebo Midori Green).
- Gel nalijeme do vaničky, nasadíme hřeben a necháme asi 1 hodinu ztuhnout.
- Ztuhlý gel přeneseme do elektroforetické vany, zalijeme pufrům 1x TBE a opatrně vytáhneme hřeben z gelu.
- Příprava velikostního markeru: 5 µl H₂O + 1,5 µl markeru molekulových hmotností (100 pb) + 0,8 µl barvičky (10x *Loading Buffer*).
- Do jamek nanese jednotlivé vzorky (10 µl) v pořadí standard Mw (4 µl), Ta, Je, 1, 2 a K-)
- Elektroforéza probíhá při konstantním napětí 70 V asi 1,5 – 2 hod.

Vyhodnocení agarózového gelu

Agarózový gel umístíme na UV-transluminátor a zdokumentujeme fotoaparátem.

Výsledky a závěr

U hodnoceného genotypu byl v poloze SSR markeru EBmac606 na chromozomu 6H vyhodnocen délkový polymorfismus odpovídající rodiči s větší / menší tolerancí k suchu.

Vzhledem vazbě tohoto SSR markeru s QTL tolerancí k suchu má genotyp větší předpoklad vykazovat vyšší toleranci k suchu.

7.7 Analýza genů *VrnH2* u rostlin v potomstvu křížení ječmenů *Tadmor x Jersey*

Protokol 3

Náplň blokového cvičení:

- poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu,
- úvod do řešené problematiky,
- požadavky na přístrojové vybavení,
- použité chemikálie a plast,
- izolace DNA,
- PCR,
- horizontální agarózová elektroforéza,
- zhodnocení výsledků laboratorního cvičení

Poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu – viz příloha Provozní řád laboratoře

Úvod do řešené problematiky

Adaptace pšenice a ječmene na různé podmínky prostředí je z velké části ovlivněna dobou kvetení, která je určována 3 skupinami genů: *VRN*, *PPD* a *EPS*. Ozimé a jarní genotypy se od sebe liší v první řadě požadavkem na délku vernalizace, což je období, během kterého dochází vlivem nízkých teplot k indukci generativní fáze. U ječmene byly popsány 3 skupiny *VRN* genů: *VRN-H1* (5H); *VRN-H2* (4H), *VRN-H3* (1H), přičemž pro odlišení ozimých a jarních genotypů jsou důležité první dva.

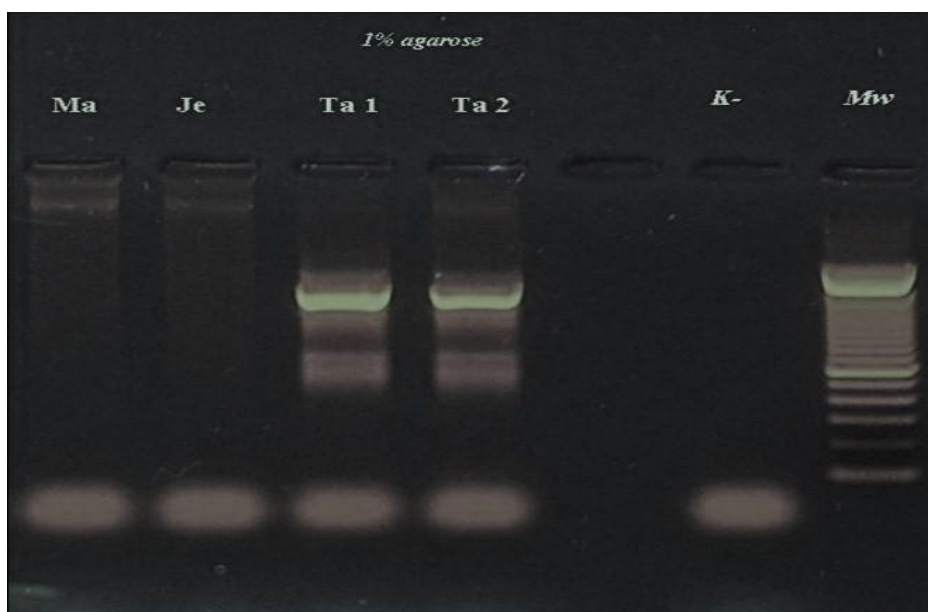
U Triticeae je gen *VRN-2* epistatický vzhledem ke genu *VRN-1*. *Vrn-2* kóduje dominantní represor kvetení (*ZCCT1*), který inhibuje expresi genu *vrn-1* (gen kvetení – produkt označovaný AP1 – aktivátor kvetení). Ozimé genotypy mají na počátku zimního období aktivní gen *VRN-H2*. Produkt tohoto genu (represor kvetení) blokuje expresi genu *VRN-H1*. V průběhu vernalizace dochází k zablokování exprese genu *VRN-H2* a tím je umožněna aktivace genu *VRN-H1*. U jarních genotypů nedochází k represí *VRN-H1* buď v důsledku nefunkčnosti genu *VRN-H2*, nebo v důsledku mutace nejčastěji v promotorové sekvenci *VRN-H1* (je postiženo vazebné místo pro represor).

Hodnocené rodičovské odrůdy *H. vulgare* L:

- 1) Tadmor (Ta) – syrská krajová odrůda, ozimý typ s krátkým vernalizačním požadavkem, tolerance k suchu.
- 2) Jersey (Je) – jarní odrůda (bez vernalizačního požadavku) s vysokou sladovnickou kvalitou, odrůda byla vyšlechtěna v Holandsku.

Rozdílný fenotyp (ozim/jař) je u těchto dvou odrůd dán pravděpodobně také odlišnými alelami genů *VRN-H2*. Naše předchozí analýzy ukázaly, že Jersey má zřejmě delecii v oblasti genu *VRN-H2* (Obr. 15). Tato mutace je recesivní. Pokud je jarní fenotyp u odrůdy Jersey způsoben jen touto mutací, lze očekávat že v potomstvu budou mít recesivní homozygoti v tomto genu jarní fenotyp. Systém, který budeme využívat, navrhl Von Zitzewicz (2005). Je založen na společné amplifikaci dvou těsně vázaných genů *Vrn-H2* genů, (*ZCCTHa* a *ZCCT-Hb*) pomocí primerů HvZCCT.001 (5'-CACATGATGTCGCCCGTTC-3')

HvZCCT.002 (5'-GGACTCGTAGCGGATTTGC-3')



Obr. 15 Příklad detekce recesivních alely genu *vrnH2* u jarních odrůd ječmene Malz (Ma) a Jersey (Je) a dominantní alely tohoto genu *VrnH2* u ozimé odrůdy Tadmor

Pozn.: Pro zpřesnění výsledků reakce se někdy využívá multiplex PCR *Vrn-H2* (*ZCCT-Ha/ZCCT-Hb*)/*Snj2*). Gen *Snj2* leží v těsné blízkosti hodnocených genů. V naší úloze toto ověření reakce nebudeme využívat.

Cíl práce: Na základě hodnocení genů *VRN-H2* určit pravděpodobný fenotyp rostlin F5 generace křížení Tadmor x Jersey

Požadavky na materiál, chemikálie a technické vybavení laboratoře

Rostlinný materiál:

- rostliny rodičovských odrůd (Tadmor, Jersey),
- 4 rostliny F₅ potomstva odvozeného z křížení těchto odrůd.

Požadavky na přístrojové vybavení:

- nádoba na tekutý dusík (Cryometal KB 20),
- třecí misky s tloučkem,
- pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a kompatibilní špičky,
- centrifuga s otáčkami min. 10 000 rpm,
- termoblok,
- vortex,
- spektrofotometr,
- horizontální elektroforéza,
- zdroj stejnosměrného proudu,
- UV-transluminátor,
- digitální fotoaparát, kamera nebo celý fotodokumentační systém,
- mrazicí box (-20 °C).

Spotřební materiál:

- mikrokumavky PCR 1,5 ml,
- PCR zkumavky 0,5 ml,
- papírové ubrousky a filtrační papír,
- rukavice.

Kity, chemikálie a použité pufry:

- DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen),
- Taq PCR Core Kit (Qiagen),
- absolutně čistý etanol (96%),

- sterilní destilovaná H₂O,
- TBE pufr: 89 mM Tris , 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA,
- agaróza,
- standard molekulových hmotností: 100 bp DNA Ladder,
- fluorescenční barvivo: Gelred nebo Midori Green.

Elektroforetický pufr – TBE (10x koncentrovaný zásobní roztok):

55 g kyselina boritá,
 108 g Tris – borát,
 9,3 g EDTA,
 doplnit do 1 l destilovanou vodou.

Postup při provádění jednotlivých metod

Měření koncentrace DNA

Roztok DNA se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci DNA, absorbance při 280 nm odráží čistotu DNA, tj. míru přítomnosti proteinů. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo 1,8; u RNA je to okolo 2. Pokud je hodnota poměru výrazně nižší než uvedené hodnoty, je DNA kontaminována proteiny.

PCR

- příprava a rozmražení potřebných chemikálií na ledu (DNA, součástí reakční směsi), po celou dobu udržujeme všechny složky reakce na ledu,
- popis zkumavek (datum a zkratka odrůdy, 0 – negativní kontrola)

Název rodičovského genotypu A

Název rodičovského genotypu B

Počet zkumavek: 5

1. zkumavka obsahující DNA rodičovský genotypu A,
2. zkumavka obsahující DNA rodičovský genotypu B,
3. zkumavka obsahující DNA rostliny 1 z potomstva (A x B),
4. zkumavka obsahující DNA rostliny 2 z potomstva (A x B),
5. zkumavka obsahující DNA rostliny 1 z potomstva (A x B),

6. zkumavka obsahující DNA rostliny 2 z potomstva (A x B),
7. zkumavka neobsahující DNA, ale vodu → negativní kontrola.

Vlastní postup provedení PCR:

- a) Příprava premixu: postupujeme podle následující tabulky (Tab. 1)

Tab. 1 Příprava premixu na 8 vzorků (Ta, Je, 4 linie, negativní kontrola + 1 vzorek)

Složka	Finální koncentrace	Objem na 1 vz. (μ l)	Objem na 8 vz. (μ l)
H ₂ O		14,9	120
10 x Cl (15 mM MgCl ₂)	1 x (1,5 mM MgCl ₂)	2,5	20
5 x Q	1x	5	40
dNTPMix (10 mM)	200 μ M	0,5	4
HvZCCT.001 (20 μ M)	0,4 μ M	0,5	4
HvZCCT.002 (20 μ M)	0,4 μ M	0,5	4
Taq DNA polymeráza	2 U	0,1	0,8

- b) Do mikrozkušavek (0,6 ml) napipetujeme po 1 μ l DNA testovaných vzorků a přidáme 1 mikrozkušavku na negativní kontrolu bez DNA (K-), do které napipetujeme 1 μ l H₂O.
- c) Do každé mikrozkušavky přidáme 24 μ l premixu a opatrně promícháme. (Následně je možno vzorky krátce stočit).
- d) PCR probíhá za následujících podmínek (Tab. 2):

Tab. 2 Teplotní podmínky reakce

Počáteční denaturace	94 °C	3 min	1x
Denaturace	94 °C	30 s	40x
Navázání primerů	62 °C	30 s	
Syntéza DNA	72 °C	1 min 30 s	
Závěrečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1x
Chlazení	4 °C	24 h	1x

Analýza PCR produktů na 1% agarózovém gelu

- a) Rozvařit 1,1 g agarózy v 110 ml pufru 1 x TBE (v mikrovlnné troubě) a po ochlazení gelu na 60 °C přidat 5 μ l barvičky GelRed.
- b) Nalít gel do vaničky s hřebenem a po zatuhnutí (asi 1 hod) nanést vzorky (10–20 μ l) a 4 μ l standardu molekulových hmotností (100 pb).
- c) Elektroforéza probíhá při konstantním napětí 70V asi 1,5–2 hod.
- d) Vizualizace produktů na gelu – na UV-transluminátoru + FOTO.

Výsledky a závěr

Vzorek	Tadmor	Jersey	1	2	3	4
Alela VRN-H2*						
Předpokládaný fenotyp						

* *Vrn-H2* (Tadmor); *vrn-H2* (Jersey)

Na základě výsledků analýzy genu *VRN-H2* v potomstvu křížení odrůd Tadmor x Jersey lze předpokládat, že genotyp má stejnou alelu genu *VRN-H2* jako rodičovská odrůda a mohl by tedy mít stejný vernalizační požadavek.

(Pozn.: Určení fenotypu jen na základě hodnocení této reakce není jednoznačné, protože u rodičů neznáme alely genu *VRN-H1*).

7.8 Hodnocení normalizované relativní exprese (NRE) genů

Rozdílné vlastnosti fenotypů nejsou pouze výsledkem přítomnosti odlišných alel genů nebo QTL nebo jejich odlišnou kombinací, ale velký vliv mají i rozdíly v regulaci exprese jednotlivých genů. Za definovaných podmínek se tedy genotypy mohou odlišovat množstvím produktů těchto genů. Rozdíly v expresi mohou být způsobeny mechanismy na různých úrovních regulace, nejčastěji bývá hodnocena transkripční aktivita genů pomocí normalizované relativní exprese. Expresi genů lze také hodnotit na úrovni jejich odpovídajících produktů, tj. proteinů.

Aktivace genů

NRE (konkrétně rozdíly v NRE) je možné hodnotit v rámci určitého souboru genotypů (nejméně 2), které byly vystaveny stejným podmínkám aktivace, ať již vnitřními (klíčení, kvetení, dozrávání zrna apod.) nebo vnějšími faktory (působením abiotického stresu, exogenně aplikovanými hormony, výživou apod.).

V následující části jsou stručně popsány postupy celé metodiky včetně částí, které nelze z časových důvodů realizovat v rámci jednoho blokového cvičení.

Izolace RNA

Kit: RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)

Příprava:

- zajistit „RNease free“ prostředí,
(Nástroje i chemikálie, sterilizace místnosti – NaOH, SAVO, UV přes noc. Mikrozskumavky, špičky je nutné sterilizovat v autoklávu, pokud nejsou „RNease free“. Také třecí misky je nutné sterilizovat v autoklávu, nebo použít SAVO. Používat pouze „RNease free“ H₂O, která je součástí kitu).
- připravit jednotlivé složky kitu,
(Do extrakčního pufru RLT nebo RLC musí být před použitím přidán β -merkapt ethanol (10 μ l β -ME/ 1 ml RLT). Takto připravený pufr je stabilní asi 1 měsíc. Do pufru RPE přidat 4 objemy 96% etanolu).

- manipulace s rostlinným materiálem,

(Pokud nelze použít čerstvý materiál pro okamžitou izolaci, je nutno vzorky po odstřížení a zvážení okamžitě zamrazit v kapalném N₂. Zamražené je lze skladovat i několik měsíců při -70 °C. Při homogenizaci přenést z -70 °C do kapalného N₂, rozdrtit v předchlazené třecí misce na prášek. Zmražený ani rozdrcený materiál nesmí nikdy rozmraznout bez přítomnosti extrakčního pufru).

Vlastní izolace:

- a) 100 mg tkáň rozdrtit ve vymražené třecí misce s kapalným dusíkem, přenést do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml, ve které bylo předem napipetováno 450 µl pufru RLT (nebo RLC). Silně vortexovat, krátce inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
- b) Přelít lyzát přímo na Q fialovou kolonku, umístěnou ve zkumavce (2 ml) a centrifugovat 2 min max. rychlostí. Opatrně přenést supernatant do nové mikrozkušavky (1,5 ml).
- c) Přidat 0,5 V (asi 225 µl) 96% etanolu a okamžitě promíchat pipetováním.
- d) Vzorek (včetně možné sraženiny) nanést na růžovou kolonku a centrifugovat 15 s při 10 000 rpm. To, co proteče, vyhodit!
- e) Přidat 700 µl pufru RW1, centrifugovat 15 s 10 000 rpm (promývá se tím kolonka). Proteklá fáze se vylije.
- f) Přenést kolonku do nové mikrozkušavky (2 ml). Na kolonku nanést 500 µl pufru RPE. Centrifugovat 15 s 10 000 rpm. Proteklá fáze se vylije.
- g) Na kolonku přidat 500 µl pufru RPE, centrifugovat 2 min při 10 000 rpm. Proteklá fáze se vylije.
- h) Kolonku umístit do nové mikrozkušavky (2 ml) a centrifugovat naprázdno 1 min, při maximálních otáčkách = dokonalé vysušení kolonky
- i) Přenést kolonku do nové mikrozkušavky (1,5 ml), nanést 100 µl H₂O, centrifugovat 1 min při 10 000 rpm.

Purifikace RNA – Turbo DNase (Ambion)

Zbytková DNA je štěpena DNázou. Tento krok je nezbytný zvláště tehdy, když použité primery nerozliší genomovou DNA od cDNA, např. když gen neobsahuje intron(y) nebo jsou primery navrženy dovnitř exonu.

Postup štěpení:

- **VZOREK + 0,1 V 10xTurbo buffer a + 0,5 µl Turbo DNase,**
- inkubovat 30 min při 37 °C,
- přidat **0, 5 µl Turbo DNase,**
- pokračovat v inkubaci dalších 30 min při 37 °C.

Inaktivace nukleázy:

- promíchat **DNase Inaktivatation Reagent** vortexováním,
- přidat **0,1V DNase Inaktivatation Reagent** ke vzorku a promíchat,
- inkubovat 2 min při pokojové teplotě, v průběhu 2x promíchat,
- centrifugovat 2 min při 6000 rpm,
- opatrně odpipetovat vodnou fázi (obsahuje RNA) do nové mikroskopické kumavky (sediment vyhodit).

Vyrovnění množství RNA ve vzorcích

Ve všech vzorcích, které společně budou srovnávány je **změřena RNA** (spektrofotometricky) a vyrovnána na stejnou koncentraci 500 – 1000 ng/12 µl vzorku. Tento krok je důležitý pro následující kvantifikaci.

Pozn.: Nukleové kyseliny se měří při A_{260} ; čistota nukleových kyselin bývá hodnocena na základě stanovení poměru absorbance při 260 a 280 nm. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu A_{260}/A_{280} okolo 1,8; u RNA je to okolo 2.

Syntéza prvního řetězce cDNA**QuantiTec®t Reverse Transcription Kit (Qiagen)**

Syntéza cDNA je syntézou DNA podle templátové RNA molekuly. Syntéza je katalyzována speciálním enzymem reverzní transkriptázou. Syntézou cDNA můžeme získat kódující sekvenci celých genů, tj. sekvenci bez intronů. Pro iniciaci syntézy jsou jako primery využívány poly-T (komplementární k poly-A na konci mRNA) nebo se využívá směs náhodných hexanukleotidů nebo i specifické oligonukleotidy (*reverse primer*), pokud chceme získat cDNA jen k nějakému konkrétnímu genu (patogenu).

Syntéza cDNA probíhá v těchto krocích:

- denaturace RNA a primeru (odstranění případných sekundárních struktur RNA,
- syntéza DNA řetězce podle řetězce RNA,
- odstranění RNA řetězce pomocí RNasy H,
(Reakce probíhá 30 min při 50 °C).

Pozn.: Použitý kit obsahuje 2 typy univerzálních primerů poly-T i náhodné hexanukleotidy. Výsledkem je jednořetězcová cDNA. Podle každé molekuly RNA ve vzorku je syntetizována pouze 1 molekula cDNA.

Vlastní qPCR v systému s barvivem SYBR Green

QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit

Pro kvantifikaci DNA je využíváno schopnosti interkalačního barviva SYBR Green I vázat se mezi dvouvlákna DNA (dsDNA). V průběhu cyklu je nejprve DNA denaturována na jednotlivá vlákna, do kterých se barvivo neinterkaluje. Barvivo SYBR Green I je vázáno až na nově syntetizovanou dsDNA. Během elongace vzrůstá množství navázaného barviva. Tím se zvyšuje intenzita fluorescence, která je měřena na konci elongační fáze každého cyklu. Začátek nárůstu fluorescence měřeného vzorku nad hodnotu fluorescence pozadí je závislý na počáteční koncentraci DNA ve vzorku. Interkalační schopnost SYBR Greenu je i jeho nevýhodou. Neumí rozlišit cílovou dsDNA od případné kontaminace nescifickou dsDNA. Úroveň fluorescence pozadí může být také zvyšována interkalací barviva mezi dimery primerů. Pro odhalení nescifického signálu (kontaminace) je na konci každé PCR reakce prováděna analýza křivky tání výsledných produktů (teplota tání závisí na jejich sekvenci).

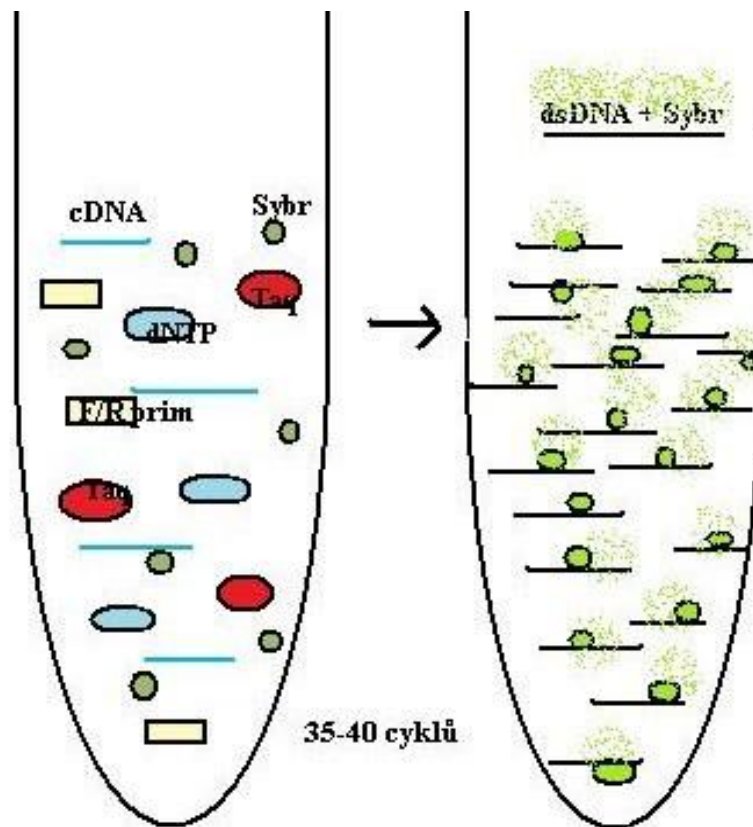
Stejně množství cDNA (obvykle 1 µl 10x zředěné cDNA) se přidají do reakční směsi (tzv. premix), který obsahuje:

- pufr s 1,5 mM Mg²⁺ a barvivo SYBR Green,
- směs dNTP,
- “forward” primer,
- “reverse” primer,
- Taq polymerázu.

Premix se rozpipetuje do platíčka, přidají se vzorky cDNA, platíčko se uzavře průhlednou folií a umístí do cyklieru. Po nastavení podmínek se reakce spustí.

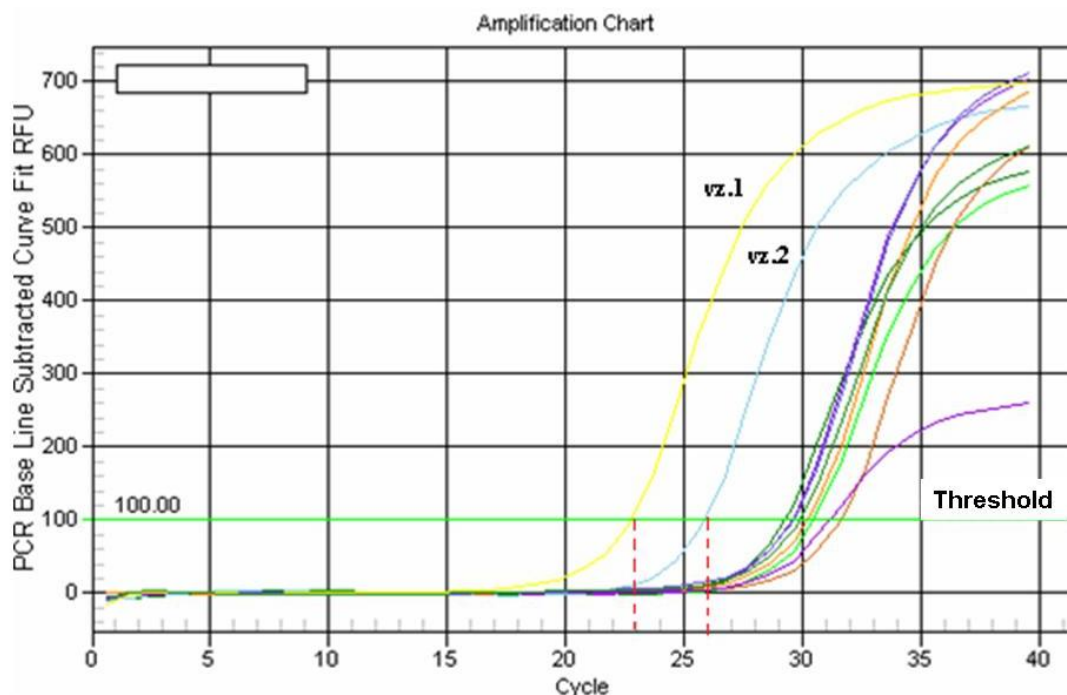
Podmínky reakce (probíhá střídání cyklů jako u klasické PCR):

- denaturace (93 – 94 °C),
- navázání primerů „annealing“ (45–65 °C podle T_m obou primerů –závisí na sekvenci),
- syntéza nového DNA řetězce (68–72 °C podle použité Taq polymerázy).



Obr. 16 Schéma qPCR (SYBR Green)

SYBR Green se během cyklů váže na vznikající dsDNA a touto vazbou se aktivuje – emituje fluorescenční záření (schéma viz Obr. 16), které je průběžně snímáno a vyhodnocováno. Nárůst fluorescenčního signálu vidíme na obrazovce jako narůstající křivku. Každá křivka představuje jeden vzorek (Obr. 17)



Obr. 17 Příklad křivek dokumentujících průběh syntézy DNA během qPCR

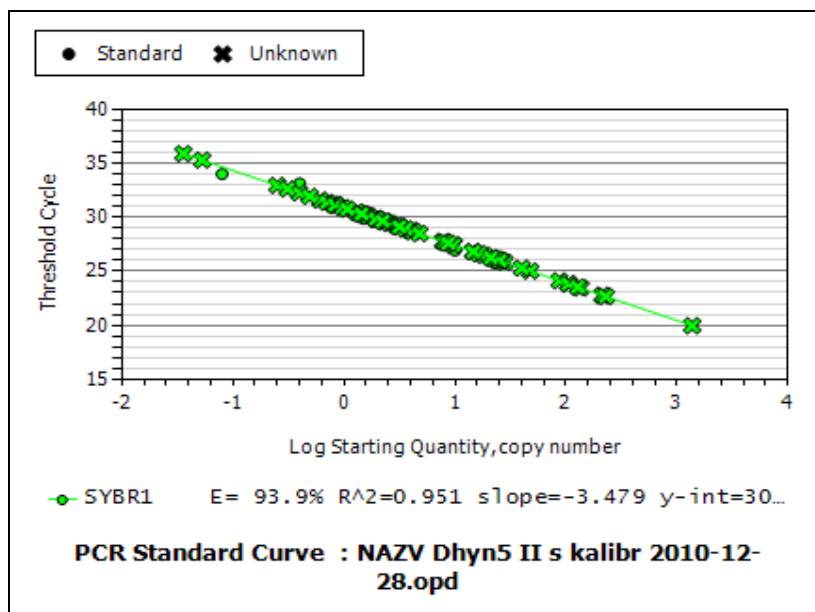
Do grafu (Obr. 17) je na osu x vynášen počet proběhlých cyklů a na ose y velikost fluorescenčního signálu. Z tohoto grafu se odečítají hodnoty C_T , které představují počet cyklů PCR, které byly nutné pro to, aby vznikající fluorescenční signál v daném vzorku dosáhl předem stanovenou úroveň, tak zvaný „threshold“

Příklad z obrázku 18: „Threshold“ je zadán 100 RFU (zadáva se do oblasti počáteční exponenciální fáze tak, aby byl vhodný pro odečítání všech vzorků v daném pokuse). Vzorek č. 1 má $C_T = 23$ a vzorek č. 2 $C_T = 26$. Znamená to, že ve vzorku č. 1 bylo více specifického substrátu než ve vzorku č. 2. Ve vzorku č. 1 tedy dříve vzrostl fluorescenční signál.

Pro vlastní výpočet relativní exprese (NRE) potřebujeme v testovaném vzorku znát hodnotu C_T a účinnost PCR reakce s primery pro hodnocený gen a současně hodnotu C_T a účinnost PCR s primery pro referenční gen (referenční gen je gen, jehož aktivita zůstává za hodnocených podmínek ve všech testovaných vzorcích stále stejná).

Výpočet účinnosti se provádí z absolutní hodnoty směrnice kalibrační křivky (v angličtině *slope*) (viz Obr. 18). Toto číslo vložíme do výpočtového vzorce na účinnost dle Rasmussena:

$$E = 10^{1/|\text{směrnice kalibr. křivky}|}$$



Obr. 18 Příklad kalibrační křivky využitě pro hodnocení účinnosti PCR; směrnice kalibrační křivky je označena „slope“

Kalibrační křivka, ze které vychází hodnocení účinnosti PCR, musí být provedena pro aktivovaný gen i pro referenční gen a měla by být hodnocena pro každou reakční směs (platičko).

Výpočet normalizované relativní exprese neboli normalizované relativní kvantifikace (NRQ)

1) V případě, že účinnost reakcí studovaného genu a referenčního genu není stejná, nebo jsou obě účinnosti relativně nízké (70 – 90%) je vhodné použít výpočet podle **Pfaffla**:

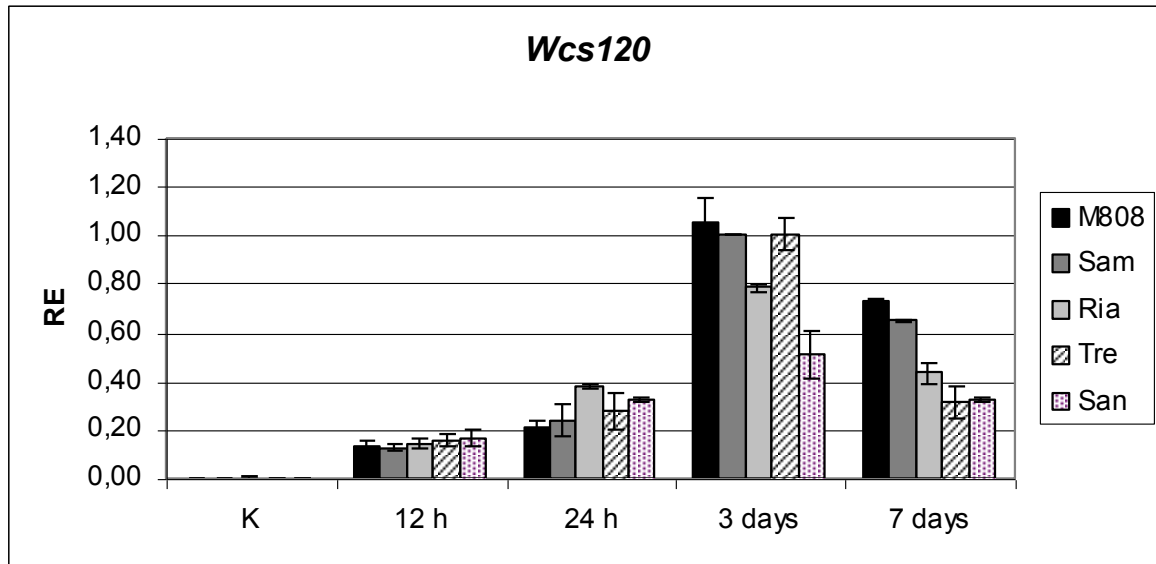
$$RE(NRQ) = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_T \text{target}}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta C_T \text{ref.}}}$$

$\Delta C_T \text{target} = C_T \text{ vnitřní kalibrátor} - C_T \text{ vzorek}$ (hodnoceno pro sledovaný gen)

$\Delta C_T \text{ref.} = C_T \text{ vnitř. kal.} - C_T \text{ vzorek}$ (hodnoceno pro referenční gen)

Vnitřní kalibrátor je jeden z hodnocených vzorků, většinou ten s nejvyšší nebo naopak nejnižší aktivitou, nebo lze dosadit hodnoty z nějaké předchozí reakce, se kterou chceme daný pokus porovnat. Hodnota exprese tohoto genu je brána jako 100 % a ostatní hodnoty jsou k ní vztahovány.

Výsledkem jsou hodnoty relativní exprese tohoto genu (relativní vzhledem k hodnotám vnitřního kalibrátoru a normalizované vzhledem k hodnotám relativní exprese referenčního genu). Tyto hodnoty jsou výstupem a z nich lze vytvořit graf (viz Obr. 19).



Obr. 19 Příklad grafického vyhodnocení výsledků relativní exprese (RE) genu Wcs120 v průběhu chladového otužování u 5 odrůd pšenice Mironovská 808 (M808), Samanta (Sam), Rialto (Ria), Trend (Tre) a Sandra (San).

2) V případě, že účinnost reakcí je stejná (blízká 100 %), je možné použít pro výpočet normalizované relativní exprese vztah podle **Livaka** a **Schmittgena**:

$$RE(NRQ) = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ ref. genu})_x - (C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ ref. genu})_0$$

x – Hodnocení za určitých podmínek aktivace

0 – hodnoty vnitřního kalibrátoru

Pro systémy s více referenčními geny lze použít např. qBase model. Zde neuveden.

7.9 Hodnocení exprese genu *Wrab17* v průběhu usychání rostlin pšenice ozimé

Protokol 4 Skupina 1 2

- poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu,
- úvod do řešené problematiky,
- požadavky na přístrojové vybavení,
- použité chemikálie a plast,
- izolace DNA,
- qPCR,
- vyhodnocení reakcí.

Poučení o bezpečnosti práce dle laboratorního řádu – viz příloha Provozní řád laboratoře

Úvod do řešené problematiky

Odolnost vůči suchu je možno částečně hodnotit na úrovni exprese genů ze skupiny *COR/LEA* (Cold regulated / Late Embryogenesis Abundant). Proteiny, které tyto geny kódují, pomáhají zadržovat vodu v buňkách – chrání ji před vysycháním. Porovnávání aktivity těchto genů za stejných stresových podmínek u různých genotypů může být použito jako tzv. RNA „marker“. Za přesně definovaných podmínek aktivace se hodnotí množství specifické mRNA. Přičemž platí, že tolerantnější genotypy reagují na stres rychleji a/nebo vyšší intenzitou exprese.

Cíl práce: Cílem této úlohy je zhodnotit aktivitu genu *WRAB17* v průběhu postupného usychání rostlin pomocí metody normalizované genové exprese (NRE) u maďarské odrůdy Békés a výsledky porovnat s hodnotami NRE získaných za stejných podmínek u české odrůdy Etela.

Požadavky na materiál, chemikálie a technické vybavení laboratoře

Požadavky na přístrojové vybavení:

- pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a kompatibilní špičky,
- centrifuga s min 3000 rpm,
- „Real Time“ PCR Cykler (BioRad iQ5),
- chladicí stojánek na plastová platíčka,
- mrazicí box (-20 °C),
- hlubokomrazicí box (-80 °C).

Spotřební materiál:

- plastové platíčko se zavírací folií,
- mikrokumavky PCR 1,5 ml,
- rukavice.

Kity a chemikálie:

- **Quanti Tect ®SYBR® Green PCR Kit (Qiagen),**
- Specifické primery (20 mM),
WRAB17: F: 5'TCCATCAACTTCAAAAATG 3'
R: 5'TGTGGTCTTCTTGGTGGCA 3'
Ubiquitin: F: 5'GCATGCAGATATTTGTGAA 3'
R: 5'GCAGCTTACTGGCCAC 3'
- Uracyl-DNA-Glykoziláza.
- „RNase free“ H₂O.

Rostlinný materiál:

Pšenice ozimá, odrůdy Békés a Etela.

Podmínky aktivace:

Pšenice byly vysety do truhlíku s hrubým perlitem a pěstovány při 12-ti hodinové fotoperiodě při teplotách 18 °C (den) a 10 °C (noc) až do stádia 3. – 4. pravého listu. Rostliny pak byly vytaženy z truhlíku a celé, včetně kořenů, osušeny na filtračním papíru.

Příprava vzorků:

Vzorky na izolaci byly odebírány v 13-ti časových intervalech. K – kontrola, 1 – 10 min, 2 – 15 min, 3 – 20 min, 4 – 25 min, 5 – 30 min, 6 – 60 min, 7 – 90 min, 8 – 2 h, 9 – 3 h, 10 – 4 h, 11 – 5 h, 12 – 6 h. Izolace RNA, purifikace a syntéza cDNA byly provedeny za pomoci komerčních kitů podle standardních protokolů (viz kapitola 7. 8).

Postup qPCR

Reakce bude provedena v systému s barvičkou SYBRGreen za pomoci kitu **Quanti Tect®SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)**

Normalizovaná relativní exprese genů bude počítána podle Pfafflova vztahu. Normalizace bude provedena proti referenčnímu genu pro ubiquitin. Výsledné hodnoty budou relativní vzhledem ke vzorku Békés v kontrolních podmínkách (B/K).

Příprava reakce:

- 1) Na ledu nechat rozmrazit vzorky cDNA, které obsahují stejné množství nukleové kyseliny (NK), a připraveno „pracovní ředění“ v poměru 1 μ l vzorku cDNA + 4 μ l H₂O.
- 2) Současně na ledu rozmrazit všechny složky kitu, roztok uracyl-DNA-glykosilázy a zásobní roztoky primerů.
- 3) Připravit ředění vybraného vzorku na 2 kalibrační křivky podle Tab. 1

Tab. 1 Ředění vzorků na kalibrační křivku

Označení	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5
Ředění	1x	10x	100x	1000x	10000x
x μ l vzorku + y μ l H ₂ O	12+0	2+18	2+18	2+18	2+18

- 4) Připravit 2 premixy na 12 vzorků (1 vzorek neaktivovaná kontrola + 4 vzorky aktivované + 5 vzorků kalibrační křivky + (K-) + 1 vzorek navíc) (Tab. 2 a 3)

Tab 2. **Premix I pro testovaný gen WRAB17**

Složka	Finální koncentrace	Objem na 1 vz. (μl)	Objem na 12 vz. (μl)
H ₂ O		6,25	75
2x konc. MIX	1 x (1,5 mM MgCl ₂)	12,5	150
Wrab17 F (20 μM)	0,4 μM	0,5	6
Wrab17 R (20 μM)	0,4 μM	0,5	6
Uracyl-glykozyláza	1U/μl	0,25	3

Tab. 3 **Premix II pro referenční gen (gen pro ubiquitin)**

Složka	Finální koncentrace	Objem na 1 vz. (μl)	Objem na 12 vz. (μl)
H ₂ O		6,25	75
2x konc. MIX	1 x (1,5 mM MgCl ₂)	12,5	150
UBI F (20 μM)	0,4 μM	0,5	6
UBI R (20 μM)	0,4 μM	0,5	6
Uracyl-glykozyláza	1U/μl	0,25	3

- 5) Do jamek platíčka napipetujeme podle schématu (Tab. 4) nejdříve po 20 μl příslušného premixu (červené vzorky premix I; modré vzorky premix II) a opatrně promícháme.
- 6) Do jamek platíčka přidáme po 5 μl pracovního ředění cDNA testovaných vzorků a kalibrační křivky a přidáme vzorek na negativní kontrolu bez DNA (K-). Napipetujeme do ní 5 μl H₂O.
- 7) Postupujeme podle schématu (obě skupiny do jednoho platíčka). Následně je možné vzorky na platíčku krátce stočit.

Tab. 4 Rozmístění vzorků na platíčku

1. skupina

2. skupina

B/K	B/4	B/6	B/9	B/12		E/K	E/4	E/6	E/9	E/12	
ST1	ST2	ST3	ST4	ST5		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	
			M16	K-					M16	K-	
B/K	B/4	B/6	B/9	B/12		E/K	E/4	E/6	E/9	E/12	
ST1	ST2	ST3	ST4	ST5		ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	
			M16	K-					M16	K-	

4) Spustíme qPCR za následujících podmínek (Tab. 5).

Tab. 5 Podmínky reakcí

Štěpení glykozylázou	50 °C	2 min	
Počáteční denaturace	94 °C	5 min	1x
Denaturace	94 °C	30 s	40x
Navázání primerů	60 °C	30 s	
Syntéza DNA	72 °C	30 s	

Vyhodnocení NRE z hodnot C_T podle **Pfaffla**:

$$RE(NRQ) = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_T \text{ target}}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta C_T \text{ ref.}}}$$

$\Delta C_T \text{ target} = C_T \text{ vnitřní kalibrátor} - C_T \text{ vzorek}$ (hodnoceno pro sledovaný gen)

$\Delta C_T \text{ ref.} = C_T \text{ vnitř. kal.} - C_T \text{ vzorek}$ (hodnoceno pro referenční gen)

Do vzorce je nutno dosadit získané hodnoty C_T a účinnost jednotlivých PCR reakcí, která se vypočítá ze směrnice kalibrační křivky podle **Rasmussena**:

$$E = 10^{1/|\text{směrnice kalibr. křivky}|}$$

Pozn.: Výpočet hodnoty směrnice kalibrační křivky je součástí softwaru použitého cykleru iQ5 (BioRad). Pro výpočet hodnot NRE je možné také použít tabulky s příslušnými vzorci v programu Excel, které studenti dostanou k dispozici.

Postup:

Vytvoří se tabulka vzorků a k nim se přiřadí příslušné hodnoty C_T z reakce PCR. Do výpočtového programu nejprve vkládáme hodnoty C_T referenčního genu a vypočtenou účinnost této reakce. Totéž se provede v druhém listu výpočtového programu pro aktivovaný gen (vložit příslušné hodnoty C_T a vypočtenou účinnost tohoto genu). V obou listech se označí hodnoty C_T vnitřního kalibrátoru. Ve spodní části listu, kde zadáváme hodnoty aktivovaného genu, je pro jednotlivé vzorky automaticky proveden výpočet relativní exprese hodnoceného genu.

Výsledky a závěr:

VZ	B/K	B/4	B/6	B/9	B/12/
CT					
NRE					
VZ	E/K	E/4	E/6	E/9	E/12/
CT					
NRE					

NRE genu *WRAB17* se oproti kontrole zvyšovala dříve u odrůdy Maximální hodnoty NRE tohoto genu byly pozorovány u vzorku odrůdy Tyto hodnoty byly x-krát vyšší než hodnoty NRE odpovídajícího vzorku odrůdy Proto lze u odrůdy očekávat lepší úroveň odolnosti vůči suchu než u odrůdy

8 Systém produkce osiva a sadby

8.1 Organizace působící v oblasti produkce a kontroly osiv a sadby

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ), zajišťuje veškeré úkony týkající se registrace odrůd a kontroly produkce osiva a sadby v České republice (<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal>).

Družstvo vlastníků odrůd (DVO) zajišťuje výběr poplatků za použití farmářského osiva právně chráněných odrůd (www.druvod.cz).

International Seed Testing Association (ISTA – Mezinárodní sdružení pro zkoušení osiva) vytváří metodické postupy pro odběr vzorků a zkoušení osiva a sadby. V členských zemích jsou zřízeny akreditované laboratoře (Praha), které provádějí všechny předepsané zkoušky osiva podle závazných metodik a na jejich základě vydávají ISTA certifikáty. Tyto certifikáty mají mezinárodní platnost a jsou obvykle požadovány u osiv vyvážených do států mimo EU (www.seedtest.org).

Union internationale pour la protection des obtentions végétales (UPOV – Mezinárodní unie pro ochranu odrůd) vypracovává pravidla pro zkoušení odrůd pro registraci a zajištění právní ochrany registrovaných odrůd včetně odvodu licenčních poplatků. Právní předpisy platné v ČR jsou plně kompatibilní s pravidly UPOV (www.upov.int).

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD – Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj) vytváří systém pravidel pro mezinárodní obchod s osivem (mimo členské státy EU). Certifikační systém se týká pouze osiva, je zaměřen na kontrolu druhové a odrůdové čistoty a pravosti, která spočívá v hodnocení množitelského porostu a provádění vegetačních zkoušek (www.oecd.org).

Českomoravská šlechtitelská a semenářská asociace (ČMŠSA) sdružuje šlechtitelské, semenářské i výzkumné organizace, zastupuje je v jednání se státními institucemi (MZe, ÚKZÚZ), podílí se na tvorbě nových legislativních a odborných norem, vydává odborná stanoviska, pořádá školení a semináře (www.cmssa.cz).

International Seed Federation (ISF – Mezinárodní semenářská federace) vznikla v roce 2002 sloučením ASSINSEL (*Association Internationale des Sélectionneurs pour la Protection de Obentions Végétales*, Mezinárodní asociace šlechtitelů pro ochranu odrůd) založené v roce 1938 a FIS (*Fédération Internationale du Commerce des Semences*, Mezinárodní semenářská

asociace) založené v roce 1924. Federace zastupuje šlechtitelské a semenářské firmy (www.worldseed.org).

8.2 Legislativa

Zásady pro registraci odrůd, právní ochranu, obchodování s osivem a sadbou a použití odrůd jsou vymezeny následující legislativou:

Zákon č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin

(zákon o oběhu osiva a sadby).

Zákon č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrůdám rostlin.

Zákon č. 242/2000 Sb., o ekologickém zemědělství.

Zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty.

Vyhláška č. 129/2012 Sb., kterou se stanoví podrobnosti o uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu.

Vyhláška č. 61/2011 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků, postupy a metody zkoušení osiva a sadby.

Vyhláška č. 378/2010 Sb. o stanovení druhového seznamu pěstovaných rostlin.

Vyhláška č. 8/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti pro posouzení vhodnosti názvů odrůd pěstovaných rostlin.

Metodika zkoušení osiva a sadby (MZe, 2004) závazné postupy pro stanovení osivové hodnoty (kvality sadby).

8.3 Registrace odrůd

Každá nová odrůda, má-li být použitelná pro zemědělskou výrobu, musí projít registračním řízením a splnit legislativní požadavky. V České republice zkoušení pro registraci zajišťuje ÚKZÚZ. Během zkoušení se ověřují všechny požadované vlastnosti nové odrůdy. Základní podmínkou pro registraci je prokázání určité originality nové odrůdy a jejího přínosu pro pěstování v porovnání se stávajícími odrůdami.

Odrůda při registraci musí splňovat následující předpoklady:

- odlišitelnost (odrůda se musí zřetelně odlišovat projevem nejméně jednoho znaku od každé jiné odrůdy registrované v ČR nebo jiném členském státě EU),
- uniformita (odrůda musí být dostatečně jednotná v projevu znaků, které se zahrnují do zkoušení odlišnosti s výhradou odchylek, které lze oprávněně očekávat v důsledku zvláštností jejího rozmnožování),
- stálost (odrůda je stálá, jestliže v projevu znaků zahrnutých do zkoušení odlišnosti zůstává beze změny po opakovaném množení na konci každého rozmnožovacího cyklu),
- užitná hodnota (odrůda má užitnou hodnotu, jestliže vykazuje souhrnem svých vlastností ve srovnání s jinými registrovanými odrůdami alespoň v některé pěstitelské oblasti zřejmý přínos pro pěstování nebo pro využití produkce, užitná hodnota se nezjišťuje u zeleninových, ovocných a okrasných druhů, u trav, které nejsou určeny k pícnímu využití, a u odrůd registrovaných pouze pro produkci osiva pro vývoz mimo státy EU),
- vhodný název (jméno odrůdy nesmí být shodné nebo zaměnitelné se jménem jiné odrůdy stejného druhu registrované v kterémkoliv státě EU, nesmí vyvolávat nesprávné představy o hodnotě nebo vlastnostech odrůdy, nesmí být jazykově nevhodné, vulgární apod.),
- zajištěné udržovací šlechtění (udržovací šlechtění – systematický způsob reprodukce podle obecně uznávané praxe, který zajišťuje zachování uniformity a stálosti dané odrůdy).

Odrůdy registrované v ČR jsou uvedeny v seznamu odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ČR k určitému datu (www.ukzuz.cz) a zároveň jsou zapsány do Společného katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin. Pro zeleniny existuje Společný katalog odrůd druhů zeleniny. Společné katalogy odrůd jsou sestaveny na základě národních seznamů odrůd členských států EU (katalogy a dodatky jsou pravidelně zveřejňovány v Úředním věstníku Evropské unie; www.europa.eu).

U všech plodin, jejichž seznam je uveden ve vyhlášce č. 378/2010 Sb. (tzv. druhový seznam), je možné obchodovat s osivem nebo sadbou pouze v případě, že jde o odrůdu zapsanou ve

Státní odrůdové knize ČR (odrůda prošla registračním řízením ÚKZÚZ), nebo ve Společném katalogu odrůd (odrůda byla registrována aspoň v jednom členském státě EU).

8.4 Produkce rozmnožovacího materiálu rostlin

Způsoby reprodukce rostlin:

1. generativní (semeny); druhy samosprašné, cizosprašné nebo přechodné,
2. vegetativní (sadbou).

Rozmnožovací materiál pěstovaných rostlin:

1. osivo = semena k rozmnožování nebo pěstování rostlin (za osivo se z legislativního hlediska považuje i sadba brambor),
2. sadba = rostliny nebo části rostlin sloužící k rozmnožování nebo pěstování (hlízy, oddenky, cibule, sazenice révy, školkařské výpěstky, sadba chmele, výpěstky získané z buněčných nebo tkáňových kultur).

Komerční produkce osiva (sadby) všech významných zemědělských druhů je vymezena legislativně a podléhá určité kontrole.

Kategorie rozmnožovacího materiálu jsou definovány vzhledem ke garanci kvality a odrůdové pravosti a čistoty osiva/sadby, která je kontrolována procesem uznávacího řízení. U kategorií nepodléhajících uznávacímu řízení za kvalitu odpovídá pouze producent (Tab. 1).

Stupně množení – počet přesevů navazujících na udržovací šlechtění, závisí na způsobu udržování odrůdy, koeficientu množení daného druhu a poptávce po osivu. Maximální počet přesevů (generací/reprodukcí u vegetativně množných druhů) je daný vyhláškou (č. 29/2012 Sb.).

Tab. 1 Kategorie rozmnožovacího materiálu rostlin

Kategorie rozmnožovacího materiálu		Symbol	Uznávací řízení	Barva návěšky
Šlechtitelský (výchozí materiál)			ne*	fialová
Předstupně	Superelita	SE 1	ne*	bílá s fialovým příčným pruhem po diagonále šíře 5 mm
		SE 2		
		SE 3		
Základní	Elita	E	ano	bílá
Certifikovaný	jediná generace	C	ano	modrá
	1. generace	C 1	ano	modrá
	2. generace	C 2	ano	červená**
	3. generace***	C 3	ano	červená
Standardní		S	ne	tmavě žlutá
Obchodní		O	ne	hnědá
Směsi (druhov é a odrůdové)			komponenty ano	zelená
Osivo s neukončenou certifikací				šedá
Osivo úředně nezapsaných odrůd			ne	oranžová
Certifikovaný materiál sdružené odrůdy			komponenty ano	modrá se zeleným příčným pruhem po diagonále
Konformní		CAC	ne	

* v případě, že osivo není uváděno do oběhu nebo využito pro výrobu certifikovaného materiálu

** u brambor modrá

*** pouze u lnu

Šlechtitelský rozmnožovací materiál je získáván postupem udržovacího šlechtění, je vyráběný udržovatelem odrůdy nebo pod jeho dohledem, nepodléhá uznávacímu řízení.

Rozmnožovací materiál předstupňů také nepodléhá uznávacímu řízení, pokud není uváděn do oběhu nebo využíván pro výrobu certifikovaného materiálu. U většiny plodin jsou povoleny tři generace v kategorii rozmnožovací materiál předstupňů (SE1, SE2 a SE3), výjimku tvoří brambory (SE1 a SE2), řepa (SE1) a hybridní odrůdy, u kterých se tato kategorie nepoužívá.

Základní rozmnožovací materiál lze vyrobit ze všech výše uvedených kategorií, slouží k výrobě certifikovaného materiálu, podléhá uznávání. U většiny druhů je povolena pouze jedna generace (E), u brambor tři generace (E1, E2 a E3).

Certifikovaný rozmnožovací materiál může být produkovaný z uznaného osiva všech výše uvedených kategorií, podléhá uznávacímu řízení, používá se pro běžnou produkci. U žita, kukuřice, čiroku, trav, jetele, hořčice, máku, řepky a všech hybridních odrůd je přípustná

pouze jedna generace certifikovaného osiva (C), u pšenice, ječmene, ovsa, tritikale, luskovin, bramboru a vojtěšky jsou možné dvě generace (C1 a C2; u bramboru A a B), u lnu tři generace (C1; C2 a C3).

Standardní rozmnožovací materiál – materiál registrovaných odrůd zelenin, nepodléhá certifikaci, pouze následné kontrole, musí splňovat kvalitativní kritéria daná vyhláškou (č. 129/2012 Sb.).

Obchodní rozmnožovací materiál – lze produkovat pouze u druhů uvedených ve vyhlášce 129/2012 Sb. (např. lesknice vodní, lipnice roční, vičenec, hořčice černá), musí splňovat požadavky na pravost a čistotu druhu, nepodléhá uznávacímu řízení.

Směs osiv odrůd jednoho nebo více druhů určené pro zemědělskou produkci – komponenty náležející k druhům uvedeným v druhovém seznamu musí splňovat všechny požadavky dané legislativou (pouze registrované odrůdy, uznané osivo).

Osivo s neukončenou certifikací – bylo sklizeno v jiném státě (i mimo EU) z uznaného množitelského porostu a dovezeno k uznání do ČR, nebo bylo sklizeno v ČR a je určeno k vývozu a certifikaci v jiném státě.

Osivo úředně nezapsaných odrůd – osivo odrůd v registračním řízení lze v omezeném množství uvádět do oběhu za účelem provedení provozních zkoušek, pouze s povolením ÚKZÚZ. Osivo musí splňovat požadavky na vlastnosti certifikovaného materiálu, nepodléhá uznávacímu řízení.

Konformní rozmnožovací materiál – rozmnožovací materiál ovocných druhů určený k výrobě sadby, je odrůdově pravý a čistý, nepodléhá uznávacímu řízení.

Rozmnožovací materiál zemědělských druhů, chmele, révy, ovocných druhů a zeleniny se smí prodávat pouze v případě, že byl uznán v kategorii šlechtitelského materiálu, předstupňů, základního nebo certifikovaného materiálu. U registrovaných odrůd zeleniny lze dále produkovat osivo v kategorii standardní, u ovocných druhů je přípustný konformní materiál, u révy standardní materiál a u druhů uvedených ve vyhlášce (č. 129/2012 Sb.) obchodní osivo. Osivo druhů neuvedených v druhovém seznamu certifikaci nepodléhá. Výše uvedený systém platí pro ČR, v ostatních zemích jsou určité odlišnosti především v počtu kategorií a generací u jednotlivých plodin a v jejich označování.

Další druhy osiva

Rozmnožovací materiál pro ekologické zemědělství – výroba osiva a sadby pro ekologické zemědělství podléhá také zákonu č. 242/2000 Sb., o ekologickém zemědělství.

Rozmnožovací materiál geneticky modifikovaných odrůd musí splňovat také podmínky definované v zákoně č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty.

Farmářské osivo – osivo (sadba) produkované pěstitelům pro vlastní použití. Vlastní osivo je možné produkovat u odrůd typu linie, populace, nebo klonu. Každým přesevem odrůda ztrácí na kvalitě, je nutné dodržovat hlavní semenářské zásady a hlídat druhovou a odrůdovou čistotu a zdravotní stav porostu. Pěstitelé používající farmářské osivo právně chráněné odrůdy jsou povinni uhradit poplatek držiteli šlechtitelských práv. Držitele šlechtitelských práv zastupuje **Družstvo vlastníků odrůd**, které také zajišťuje výběr poplatků za použití farmářských osiv. Pro jednotlivé odrůdy je každoročně stanovena úhrada za každý hektar oseté plochy, obvykle činí 50 % z licence certifikovaného rozmnožovacího materiálu. Podmínky použití farmářského osiva jsou vymezeny zákonem č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrůdám rostlin.

Balení a označování uznaného materiálu

Způsob balení a označování uznaného materiálu (osivo/sadba) je stanoven vyhláškou č. 129/2012 Sb. Osivo může být prodáváno pouze v uzavřeném obalu, který musí být opatřen úřední návěškou se všemi předepsanými údaji. K povinným údajům patří druh, odrůda, stupeň množení, číslo množitelského porostu nebo partie, hmotnost (počet kusů), datum posledního odběru vzorků, doba použitelnosti, provedená úprava osiva (obrušování, obalování, kalibrace, třídění, chemické ošetření). Osivo se obvykle uznává v té kategorii a generaci, v které byl uznán porost, množitel však může zažádat o uznání i v nižším stupni.

8.5 Uznávací řízení

Uznávací řízení – kontrola výroby osiva (sadby) registrovaných odrůd zemědělských plodin, týká se všech druhů uvedených ve vyhlášce č. 129/2012 Sb. Uznávací řízení probíhá dvoufázově, v první fázi se posuzuje a uznává množitelský porost, v druhé fázi vlastní

rozmnožovací materiál (Tab. 2). Pokud porost není uznán, není možné sklizený materiál prodávat jako osivo nebo sadbu.

Tab. 2 Schéma procesu uznávání porostů a osiva

Úkon	Zajišťuje
1. Podání žádosti o uznání porostu	žadatel
2. Přehlídka porostu a vystavení osvědčení	ÚKZÚZ
3. Vydání rozhodnutí o uznání (neuznání) porostu	ÚKZÚZ
4. Podání žádosti o uznání rozmnožovacího materiálu (osiva) a o dodání adjustačního materiálu (úředních návěsek a plomb)	žadatel
5. Odběr úředního vzorku	ÚKZÚZ
6. Zaslání vzorku do příslušné semenářské laboratoře	žadatel
7. Provedení laboratorních, příp. dalších zkoušek předepsaných pro daný druh	ÚKZÚZ nebo jím pověřená organizace
8. Vystavení rozhodnutí o uznání rozmnožovacího materiálu	ÚKZÚZ

žadatel – producent osiva, semenářská firma,

8.6 Hodnocení množitelského porostu

Hodnocení se provádí v době, kdy je vývoj rostlin nejvhodnější pro posouzení jejich rozhodujících vlastností. Počet přehlídek je stanoven, každý porost se přehlídí aspoň jednou. Přehlídky provádí inspektoři ÚKZÚZ nebo pověřené osoby. Výsledky přehlídek se zapisují do formulářů a na základě zjištěných skutečností je vystaveno rozhodnutí o uznání nebo neuznání porostu.

Při hodnocení porostu se kontroluje:

- dodržení požadavků na předplodiny,
- dodržení prostorové izolace z hlediska nežádoucího přenosu pylu nebo chorob ze sousedního porostu a z hlediska provedení sklizně,
- celkový stav porostu (zapojení, vyrovnanost, polehlost),
- čistota druhu (výskyt rostlin příbuzných druhů),
- pravost a čistota odrůdy (výskyt jiných odrůd a zřetelně odlišných typů),
- zapelevelení porostu (výskyt jiných rostlinných druhů, plevelných i kulturních, které nebyly hodnoceny v rámci druhové čistoty),
- zdravotní stav porostu (výskyt chorob a škůdců),
- u hybridů se hodnotí podíl rodičovských komponentů, provedení kastrace.

Pokud není porost uznán, sklizený materiál není možné prodávat jako osivo.

8.7 Hodnocení rozmnožovacího materiálu

Osivo musí být sklizeno z uznaného porostu, po dosušení, čištění a úpravě se provede odběr vzorků. Je předepsána maximální hmotnost partie osiva, četnost vzorkování, způsoby odběru dílčích vzorků a vytvoření laboratorního vzorku o stanovené minimální hmotnosti a rezervního vzorku (Obr. 20). Postupy pro přípravu osiva ke vzorkování a pro správné provedení odběrů jsou stanoveny vyhláškou č. 61/2011 Sb. Rozbory osiva mohou provádět laboratoře ÚKZÚZ nebo akreditované laboratoře. Pro každý druh jsou stanoveny povinné zkoušky, na žádost producenta osiva mohou být provedeny také doplňkové zkoušky. Pokud vlastnosti osiva vyhoví minimálním hodnotám stanoveným ve vyhlášce, je uznáno a může být uvedeno na trh.

Partie – osivo jedné odrůdy vypěstované na jednom pozemku a sklizené ve stejné době, jednotně ošetřené a skladované na jednom místě. Partie může být vyrobena i z více porostů stejných vlastností, případně sklizeň z jednoho porostu může být rozdělena na více partií. Každá partie má svoje číslo vytvořené předepsaným způsobem. Maximální hmotnost partie je dána vyhláškou. U větších partií se dá očekávat vyšší heterogenita osiva.

Dílčí vzorek – osiv odebrané z jednotlivých míst partie, minimální počet dílčích vzorků se stanoví podle hmotnosti partie nebo počtu obalů u baleného osiva.

Souhrnný vzorek – vznikne sesypáním a promícháním jednotlivých dílčích vzorků odebraných z určité partie.

Kontrolní (laboratorní) vzorek – zasílá se do laboratoře na rozbory, má předepsanou minimální hmotnost.

Základní vzorek – vzorek vytvořený z laboratorního vzorku pro stanovení čistoty osiva.

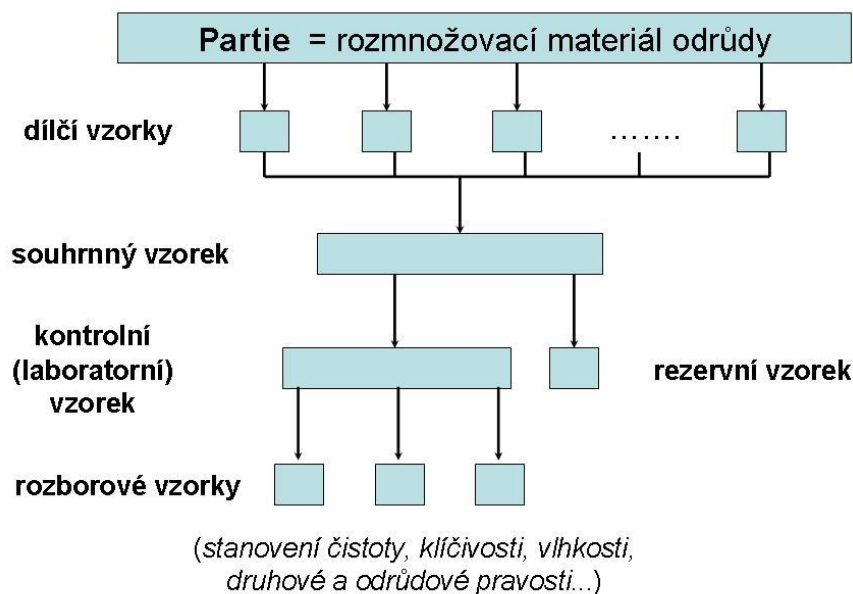
Zkušební vzorek – vzorek vytvořený z laboratorního vzorku určený pro stanovení příměsí jiných rostlinných druhů.

Rezervní vzorek – zapečetí se a uloží v podniku, lze použít pro opakované zkoušky.

Vzorek pro vegetační zkoušku – určený pro provedení vegetační zkoušky (stanovení druhové a odrůdové čistoty a pravosti, zdravotního stavu a hybridnosti).

Egalizace – sloučení partií osiva stejné odrůdy za dodržení stanovených podmínek.

Vzorkování osiva



Obr. 20 Postup při vzorkování osiva

Osivo se vždy odebírá náhodně z různých vrstev nebo částí pytlů, u volně loženého osiva se vzorky odebírají také z míst, kde lze předpokládat výskyt skladištních škůdců (okraj hromady, místa u podlahy a stěn). K odběru vzorků semen se používají ruční mechanická vzorkovadla – kovové tyče o různé délce opatřené otvory, které slouží k zachycení semen (Obr. 21). Existují také vakuová vzorkovací zařízení. U některých druhů se odběry provádí rukou, např. obtížně sypatelné trávy. Velké semenářské provozy jsou obvykle vybaveny automatickým vzorkovadlem, což je zařízení, které během manipulace s osivem, obvykle při čištění nebo plnění do obalů, v pravidelných intervalech odebírá dílní vzorky z konkrétní partie. Počet dílních vzorků se stanovuje podle množství osiva v partii, případně podle počtu balení (Tab. 3 a 4).



Obr. 21 Mechanická vzorkovadla

Tab. 3 Osivo volně ložené

Hmotnost osiva	Počet dílčích vzorků
do 500 kg	min. 5 dílčích vzorků
501–3000 kg	1 vzorek na 300 kg, min. 5 dílčích vzorků
3–20 t	1 vzorek na 500 kg, min. 10 dílčích vzorků
nad 20 t	1 vzorek na 700 kg, min. 40 dílčích vzorků

Tab. 4 Osivo balené

Počet pytlů	Počet dílčích vzorků
1	5 dílčích vzorků
2–4	3 dílčí vzorky z každého obalu
5–8	2 dílčí vzorky z každého obalu
9–15	1 dílčí vzorek z každého obalu
16–30	15 dílčích vzorků z partie
31–59	20 dílčích vzorků z partie
60–154	30 dílčích vzorků z partie
155–400	min. 1 dílčí vzorek z pěti obalů
401–566	dílčí vzorky z 80 obalů
567 a více	min. 1 dílčí vzorek ze sedmi obalů

Všechny dílčí vzorky odebrané z jedné partie se sesypou a jejich smícháním se vytvoří souhrnný vzorek. Minimální váha souhrnného vzorku musí být vyšší než součet hmotností všech vzorků pro jednotlivé zkoušky (Tab. 55). Souhrnný vzorek se předepsaným způsobem

rozdělí na vzorek kontrolní, který se zasílá do laboratoře, a vzorek rezervní. Vážení vzorků je nutné provést s dostatečnou přesností (Tab. 6).

Tab. 5 Nejvyšší povolená hmotnost partie včetně hmotností jednotlivých vzorků u vybraných plodin

Plodina	Nejvyšší přípustná hmotnost partie (kg)	Hmotnost laboratorního vzorku (g)	Hmotnost základního zkušebního vzorku (g)	Hmotnost zkušebního vzorku (g)	Hmotnost vzorku na vegetační zkoušku (g)
pšenice, ječmen, oves, žito, tritikále	30 000	1 000	120	1 000	1 000
kukuřice	40 000	1000	900	1000	1000
řepka	10 000	200	10	100	250
hořčice	10 000	400	20	200	250
slunečnice	25 000	1 000	200	1 000	250
hrách	30 000	1 000	900	1 000	1 000
mák	10 000	50	1	10	100

Základní vzorek – vzorek určený pro stanovení čistoty osiva

Zkušební vzorek – vzorek určený pro stanovení příměsí jiných rostlinných druhů

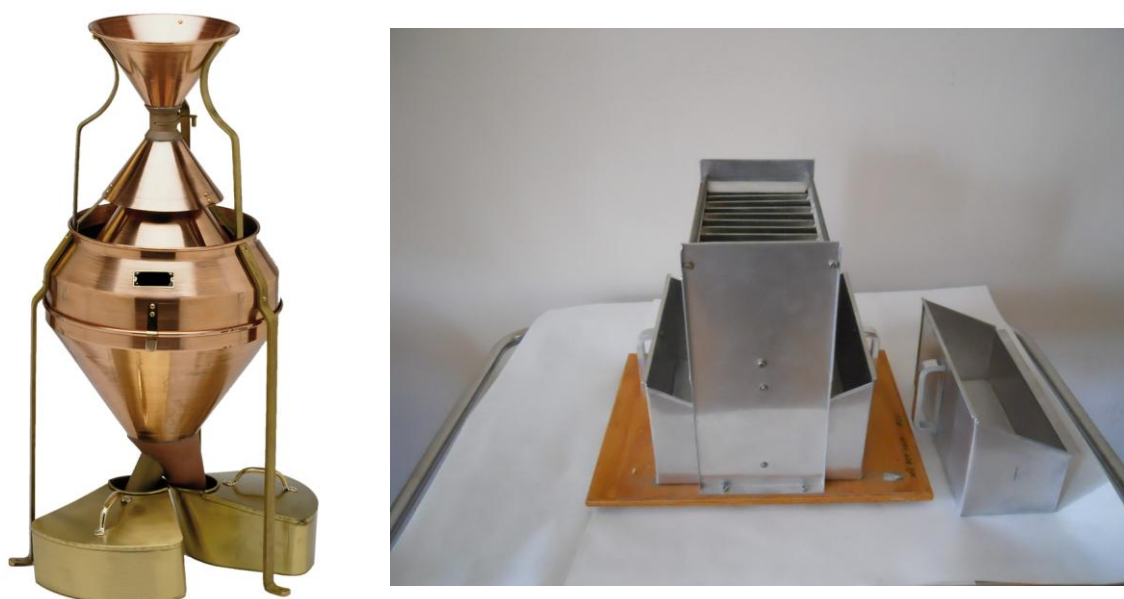
Tab. 6 Předepsaná přesnost vážení vzorků semen

Hmotnost vzorku (g)	Počet desetinných míst
1000 a více	0
100–999,9	0,0
10–99,99	0,00
1–9,999	0,000

Vzorky musí být vloženy do vhodných obalů (papírové sáčky, plastové lahvičky) a patřičně označeny. Zkoušky by měly být provedeny neprodleně, při dlouhodobém uchování je nutno dodržet skladovací podmínky.

Dělení vzorku:

- mechanickými dělidly (Obr. 22),
- ruční rozprostření do tenké vrstvy a dělení (u druhů, které se obtížně sypou, např. ovsík a trojštět).



Obr. 22 Boernerovo kónické dělidlo vzorků (vlevo) a spádové dělidlo vzorků (vpravo)

Při vzorkování musí být předloženy doklady o přehlídce a uznání množitelského porostu, nebo certifikáty o dovozu. Po přečištění, přeskladnění, přepytlování nebo asanaci osiva (sadby) lze požádat o nové vzorkování.

Všechny zkoušky a postupy prováděné při zkoušení osiv zemědělských a zahradních plodin jsou popsány v Metodice zkoušení osiva a sadby, kterou vydalo MZe v roce 2004. Laboratoř provádí všechny zkoušky předepsané pro uznání konkrétního druhu, na žádost i doplňkové zkoušky. V případě hraničního výsledku se zkouška opakuje.

Pro každý druh jsou předepsány povinné zkoušky, dodavatel má možnost požádat o provedení zkoušek, které nejsou povinnou součástí uznávání.

Povinné zkoušky pro všechny druhy:

- zkoušení čistoty,
- stanovení počtu semen jiných rostlinných druhů,
- zkoušení klíčivosti,
- zkoušení vlhkosti,
- zjišťování přítomnosti živočišných škůdců.

Speciální a doplňkové zkoušky:

- sítové třídění,
- jednoklíčkovost,
- stanovení hybridnosti,
- zkouška konduktivity,
- biochemická zkouška životaschopnosti,
- zkoušení pravosti druhu a odrůdy:
 - fluorescenční zkouška,
 - mikroreliefová zkouška,
 - elektroforéza,
- zkoušení zdravotního stavu,
- stanovení hmotnosti tisíce semen.

Stanovení čistoty osiva

Zkouška je zaměřena na zjištění podílu čistých semen ve vzorku a stanovení příměsí a nečistot.

Základní zkušební vzorek semen o dostatečné hmotnosti se zváží s přesností na předepsaný počet desetinných míst a roztřídí se na následující podíly:

- 1) čistá semena deklarovaného druhu,
- 2) semena jiných druhů kulturních rostlin a semena plevelů,
- 3) nečistoty minerální a organické (prázdňá semena, zlomky semen, ostatní části rostlin, zemina, houbové útvary, živočišní škůdci).

Ad. 1) Do podílu čistých semen patří:

- celá, normálně vyvinutá a plná semena bez zřetele na barvu,
- semena nedostatečně vyvinutá, min. 1/3 obvyklé velikosti.
- semena slabě naklíčená
- semena částečně poškozená, je zachováno min. 1/2 semene,
- nahá semena a obilky bez pluch (s výjimkou bobovitých a brukvovitých),
- semena s prasklým o semením,
- semena plesnivá a chorobná, která nejsou poškozená natolik, že nemohou vyklíčit.

Ad. 3) Do podílu nečistot patří

- semena bez klíčků (nevyvinutá, poškozená),
- nevyvinutá semena do 1/3 velikosti normálních semen,
- prázdná semena a plody (např. len, oves),
- semena silně naklíčená (kořínek přerostl osemení),
- semena silně plesnivá, zpráchnivělá, u kterých se dá předpokládat, že nevyklíčí,
- zcela oloupaná semena bobovitých a brukvovitých,
- snětivá zrna,
- sklerocie námele a jiných hub,
- hálky hád'átek,
- semena rozmáčknutá, polámaná, vyhlodaná tak, že chybí klíček nebo část s klíčkem menší než 1/2 normálního semene,
- zemina, písek, zbytky rostlin,
- živí a neživí škůdci a jejich části.

Po rozřídění se jednotlivé podíly zváží a součet jejich hmotností se nesmí odchylovat o více než 5 % od původní navážky. V případě většího rozdílu se zkouška opakuje. Ze součtu se vypočítají procenta jednotlivých podílů, výsledek se zaokrouhluje na jedno desetinné místo. Podíl pod 0,05 % se označuje jako „stopy“ a nezapočítává se.

Početní stanovení semen jiných rostlinných druhů, choroboplodných útvarů a živočišných škůdců

Zkouškou je stanoven počet semen jiných rostlinných druhů, choroboplodných útvarů a živočišných škůdců ve vzorku osiva. Ke stanovení lze použít celý zkušební vzorek nebo jen jeho část, při úplné zkoušce se sleduje výskyt všech nežádoucích příměsí, při neúplné zkoušce se zjišťuje výskyt pouze určitého druhu. Ve výsledku rozboru se uvede skutečná hmotnost vzorku osiva a počet nalezených semen jiných rostlinných druhů, jejichž semena byla nalezena ve vzorku a které bylo možné identifikovat (druhové nebo rodové jméno). Dále se zapíše výskyt choroboplodných útvarů (sklerocia, snětivé shluky) a živočišných škůdců (živí skladištní škůdci, zrnokazi u luskovin).

Zkouška klíčivosti

Cílem testu je stanovit maximální možnou klíčivost zkoušeného vzorku semen tak, aby výsledky byly opakovatelné a srovnatelné s jinými vzorky a napomohly odhadu osivové hodnoty. Klíčivost semen stanovená laboratorní zkouškou je definována jako schopnost semen poskytnout v optimálních podmínkách za stanovenou dobu maximální počet normálně vyvinutých klíčenců, u kterých je možné v optimálních půdních podmínkách předpokládat vytvoření normálních rostlin. Procento klíčivosti udává podíl semen ze vzorku, které v daném čase vyklíčily a vytvořily normální rostliny. Po dobu klíčení je nutné semenům zajistit vhodnou teplotu, dostatek vody, dostatečnou vzdušnou vlhkost (90–95 %), větrání a případně světlo.

Postup: Semena se vždy odpočítávají z podílu čistých semen, získaných při zkoušce čistoty. Obvykle se provádí 4 opakování, v jednom opakování je 100 nebo 50 semen (u velkosemenných druhů). Odpočítaná semena se rozloží na vlhký substrát tak, aby se vzájemně nedotýkala, což omezí šíření sekundárních infekcí. Jako substrát lze použít filtrační papír, písek, cihlovou drť nebo zeminu.

Filtrační papír musí být pevný, aby do něj nevrůstaly kořeny, porézní, nesmí obsahovat toxické látky, bakterie nebo plísňe. Kvalitu papíru je možné otestovat biologickým testem za použití druhů se zvýšenou citlivostí k toxickým látkám (bojínek luční, kostřava červená).

Písek musí být křemenný, čistý, bez choroboplodných zárodků a toxických látek, s pH mezi 6,0–7,5. Při opakovaném použití je nutné písek prát, sušit a sterilizovat. Kvalitu lze ověřit biologickým testem za použití hořčice bílé, pšenice nebo prosa.

Zemina nebo cihlová drť nejdou příliš doporučovány z důvodu různé jakosti, obvykle je nutná sterilizace, není vhodné opakované použití.

Voda musí být čistá, v případě méně kvalitní vodovodní vody je nutné použít vodu destilovanou nebo deionizovanou, pH mezi 6,0 až 7,5. Voda se dodává jednorázově v optimálním množství na začátku zkoušky, opakované zalévání není žádoucí.

Většina druhů klíčí na světle i ve tmě, doporučuje se světlo z důvodů pomalejšího šíření patogenních mikroorganismů, lepšího vývoje rostlin a možnosti detekce rostlin bez chlorofylu. U některých druhů může světlo přerušit dormanci (celer, troskut). Klíčení ve tmě je předepsáno např. pro svazenku.

Teplota při klíčení může být stálá (10; 15; 20; 25; 30; 35 °C), nebo střídavá (rozdíl 10 °C, nižší teplota obvykle 16 hodin, vyšší 8 hodin).

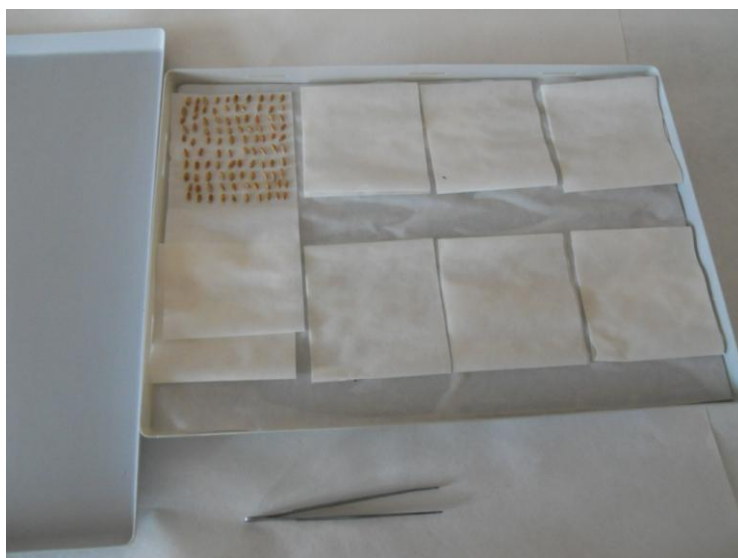
V případě použití papíru je možné použít následujících způsobů:

1. semena se nechávají klíčit na papíře v uzavřených plastových krabicích, na Jacobsenově klíčidle nebo Petriho miskách, nebo přímo na roštích v klíčících skříních,
2. semena se vkládají mezi dvě vrstvy filtračního papíru, do skládaných obálek nebo do roliček, které se umisťují do vertikální polohy,
3. semena se vkládají obvykle po dvou kusech do jednotlivých záhybů harmonikovitě složeného pruhu filtračního papíru s padesáti záhyby. Složený papír se ještě omotá dalším pruhem pro zajištění stejnoměrné vlhkosti a umístí do plastové krabice, případně na rošty klíčící skříně.

V případě použití písku nebo zeminy se semena pouze zatlačí do povrchu, nebo se pokladou na urovnanou vrstvu vlhkého písku a zasypou další vrstvou o tloušťce 10 až 20 mm.

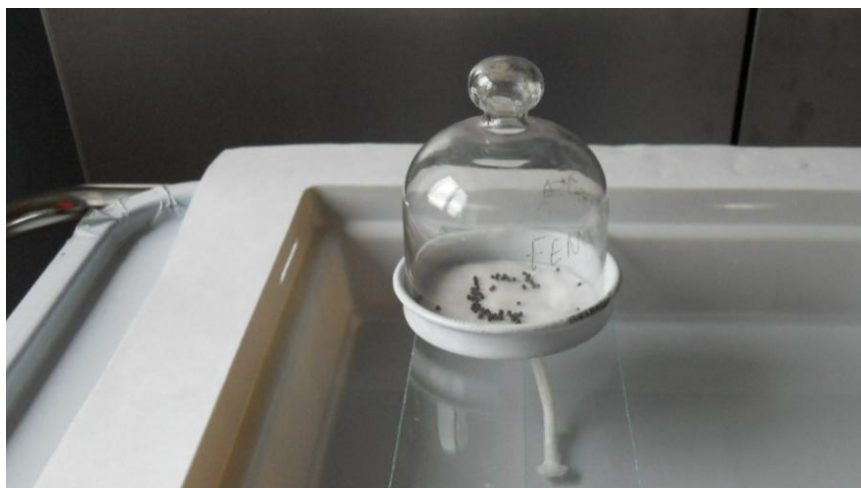
Pro klíčení se používají různá zařízení, obvykle jde o roštové stoly s vodní lázní, termostaty nebo klimatizační komory s možností regulace teploty a u některých typů i vlhkosti. Lůžka se semeny se do nich ukládají v uzavřených plastových krabicích nebo volně na tácech, případně se kladou přímo na rošty.

Nejčastěji používaná klíčidla jsou plastové nebo kovové krabice s víkem o rozměrech 30 x 40 x 10 cm (Obr. 23). Do krabice se nalije voda a nad hladinu se umístí plastová nebo skleněná deska s pásem filtračního papíru, který zasahuje do vody a funguje jako knot. Semena se kladou na desku do skládaného filtračního papíru.



Obr. 23 Plastové klíčidlo se semeny

Jacobsenovo klíčidlo (Obr. 24) se používá pro drobnější, pomaleji klíčící semena a pro semena, která při klíčení vyžadují světlo. Na desku s otvory nad vodní lázní se umístí kolečka filtračního papíru se semeny. Dostatečná vlhkost je zajišťována knoty nebo proužky filtračního papíru, které se prostrčí otvory. Semena se přikryjí průhlednými zvonky z plastu nebo skla s malým větracím otvorem, čímž se omezí vysychání. Teplota se reguluje zahříváním, případně chlazením vodní lázně, nebo klíčící desky.



Obr. 24 Jacobsenovo klíčidlo

Tab. 7 Přípustné podmínky pro zkoušku klíčivosti u vybraných druhů

Plodina	Substrát	Teplota °C		Počet dní do hodnocení		Doporučení k přerušení dormance
		Stálá	Střídavá	I. hodn.	II. hodn.	
pšenice	papír, písek	20	–	4	8	předehřátí, předchlazení, GA
ječmen	papír, písek	20	–	4	7	předehřátí, předchlazení, GA
žito	papír, písek	20	–	4	7	předchlazení, GA
oves	papír, písek	20	–	5	10	předehřátí, předchlazení
kukuřice	papír, písek	25; 20	20/30	4	7	–
řepka	papír	20	20/30	5	7	předchlazení
hrách	papír, písek	20	–	5	8	–
slunečnice	papír, písek	20; 25	20/30	4	10	předehřátí, předchlazení
mák	papír	20	–	5	10	předchlazení

Podmínky zkoušení a doba trvání zkoušky je předepsána pro jednotlivé druhy (Tab. 7). Klíčící rostliny se hodnotí v době, kdy mají dostatečně vyvinuté všechny důležité orgány a je možné

posoudit případné abnormality. Obvykle se hodnocení provádí ve dvou termínech, normální klíčenci, shnilá semena a silně zahnívajících klíčenci se během počítání odstraňují. Svěží semena a nedostatečně vyvinutí klíčenci se ponechávají na substrátu až do konce testu. V případě dosažení maximální klíčivosti již v prvním termínu hodnocení je možné zkoušku předčasně ukončit.

Normální klíčenec:

- normální, dobře vyvinutý, zdravý klíčenec (kořen, klíček, dělohy),
- mírně defektní klíčenec, u kterého je předpoklad vytvoření normální rostliny (vykazuje vady, které zásadně neovlivňují celkový vývoj),
- vzhledově normální klíčenec, druhotně infikovaný patogenem (houbou nebo bakterií, přičemž zdrojem infekce není vlastní semeno).

Abnormální klíčenec:

- špatně vyvinutý klíčenec, u kterého chybí některá důležitá část (kořen, klíček) nelze očekávat normální vývoj v rostlinu,
- klíčenec slabě rostoucí, neproporční, vykazující fyziologickou poruchu,
- klíčenec shnilý - napadený primární infekcí (ze semene).

Neklíčivé semeno:

- tvrdá semena nepřijímají vodu, nebobtnají (vikvovitě),
- semena neklíčivá, která během zkoušky zbobtnala a neklíčí z fyziologických důvodů (dormantní semena), zůstanou zdravá a svěží, lze prokázat životaschopnost biochemickou zkouškou,
- semena neklíčivá, mrtvá, prázdná, poškozená hmyzem, během testu obvykle shnijí.

Hodnocení: klíčivost se vyjadřuje jako procentický podíl počtu normálních klíčenců ze všech semen. Vypočítá se jako průměr čtyř opakování po 100 semenech. Podle průměrné hodnoty klíčivosti se v tabulce (Tab. 8) vyhledá maximální přípustný rozdíl a porovná se s rozdílem mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou. Pokud rozdíl mezi opakováními překročí stanovenou toleranci, zkouška se opakuje.

Tab. 8 Maximální povolený rozsah mezi opakováními v jedné zkoušce klíčivosti

Průměrná klíčivost (%)		max. rozdíl	Průměrná klíčivost (%)		max. rozdíl
99	2	5	87–88	13–14	13
98	3	6	84–86	15–17	14
97	4	7	81–83	18–20	15
96	5	8	78–80	21–23	16
95	6	9	73–77	24–28	17
93–94	7–8	10	67–72	29–34	18
91–92	9–10	11	56–66	35–45	19
89–90	11–12	12	51–55	46–50	20

U některých druhů je povolena předběžná příprava semen pro odstranění případných fyzikálních nebo fyziologických překážek klíčení. Doba, kterou potřebují semena k fyziologickému nebo morfologickému dozrání, se označuje jako dormance.

Způsoby předběžné přípravy semen

Přerušování dormance:

- skladování v suchu u druhů s krátkodobou dormancí,
- předběžné chlazení při teplotě 5–10 °C po dobu 1–7 dní,
- předběžné zahřívání v sušárně při teplotě 30–35 °C po dobu 1–7 dní,
- osvětlování semen během klíčení, min. 8 hod. denně při intenzitě světla 750–1250 luxů,
- vlhčení lůžka roztokem dusičnanu draselného o koncentraci 0,2 %,
- vlhčení lůžka roztokem kyseliny gibberelové o koncentraci 0,05; 0,02 nebo 0,1 %
- klíčení v zatavené polyethylenové obálce,

Odstranění tvrdosti u semen s neprostupným osemením nebo oplodím:

- krátkodobé máčení po dobu 24–48 hodin ve vodě teplé 25 °C,
- mechanické narušení osemení,
- leptání osemení koncentrovanou kyselinou sírovou nebo dusičnou.

Odstranění inhibičních látek:

- promývání semen tekoucí vodou o teplotě 25 °C,
- odstranění rostlinných částí obklopujících semeno (okvětí, plucha, pleva).

Dezinfekce osiva – ošetření fungicidem před zkouškou je povoleno pouze u řepy. U druhů, které se prodávají mořené, se obvykle zkouší mořené osivo.

Stanovení hmotnosti tisíce semen (HTS)

Z podílu čistých semen se odpočítá 2 x 500 semen, která se zváží s přesností na dvě desetinná místa. Pokud rozdíl mezi dvěma stanoveními přesáhne 5 % jejich aritmetického průměru, zkouška se opakuje (u drobných semen s HTS do 25 g je limit 10 %). Počítání je možné provádět ručně, nebo za použití počítadla semen.

HTS lze stanovit také tak, že se spočítají všechna semena z podílu čistých semen a k výpočtu se použije následující vzorec:

$$HTS = \frac{1000 * H}{PS}$$

H – hmotnost podílu čistých semen v g

PS – počet semen

Hmotnost milionu klíčivých semen (HMKS)

HMKS je hmotnost jednoho milionu klíčivých semen v kilogramech, vypočítá se podle následujícího vzorce:

$$HMKS = \frac{HTS * 10\ 000}{\text{čistota} * \text{klíčivost}}$$

U osiva s čistotou 99 % nebo 100 % lze použít zjednodušený výpočet:

$$HMKS = \frac{HTS * 100}{\text{klíčivost}}$$

Údaj o hmotnosti milionu klíčivých semen se používá pro stanovení výsevného množství u plodin, které se nesejí na přesnou vzdálenost (např. obilniny s výjimkou kukuřice, řepka, luskoviny, jeteloviny).

Stanovení vlhkosti

Vlhkost osiva je definována jako procenticky vyjádřený podíl hmotnosti vody fyzikálně vázané v osivu. Vzorek pro zkoušku vlhkosti musí být okamžitě po odebrání uzavřen ve vhodném obalu, který zamezí změně vlhkosti během přepravy (např. širokohrdlá nádoba s dobře těsnícím uzávěrem).

Laboratorní metoda: vzorek celých semen nebo šrotu se nasype do předem zvážených a vysušených vysoušeček v množství 4 až 5 g. Jemné šrotování je předepsáno pro obilniny, pohanku a vodní meloun, hrubé šrotování pro luskoviny včetně sóje, ostatní druhy se nešrotují. Šrotování musí být provedeno rychle a rovnoměrně, bez zahřívání šrotovaného

materiálu. Při hrubém šrotování musí nejméně 50 % šrotu propadnout sítím s oky 4,0 mm, při jemném musí nejméně 50 % šrotu propadnout sítím s oky 0,5 mm a nad sítím s oky 1,0 mm nesmí zůstat více než 10 % šrotu. Naplněné vysoušečky se uzavřou víčkem a zvaží s přesností 0,001 g. Otevřené vysoušečky se pak i s víčky vloží do sušárny předem vyhřáté na požadovanou teplotu, doba sušení se počítá od okamžiku, kdy teplota v sušárně znovu dosáhne požadované výše. Po předepsané době sušení se vysoušečky okamžitě uzavřou víčky, zchladí v exsikátoru a zvaží (Tab. 9).

Výpočet procenta vlhkosti:

$$\text{vlhkost} = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} * 100 \text{ (\%)}$$

M1 – hmotnost prázdné vysoušečky s víčkem

M2 – hmotnost vysoušečky s víčkem a vzorkem před sušením

M3 – hmotnost vysoušečky s víčkem a vzorkem po sušení

Vždy se provedou dvě souběžná stanovení, pokud rozdíl výsledků přesáhne 0,5 % jejich aritmetického průměru, zkouška se opakuje (pro ISTA certifikaci je přípustný rozdíl do 0,2 %). Výsledek se zaokrouhluje na jedno desetinné místo.

Tab. 9 Předepsaná teplota a doba sušení u vybraných druhů

Plodina	Teplota (°C)	Doba sušení (hod.)
luskoviny, řepa, mák, trávy, jeteloviny	130–133	1
pšenice, ječmen, žito, oves, čirok	130–133	2
kukuřice	130–133	4
řepka, hořčice, len, sója, slunečnice, lníčka, košťáloviny, cibule	103±2	17±1

Stanovení vlhkosti vlhkoměrem – měří se vlhkost šrotu nebo celého zrna. Přesnější jsou kalibrovatelné přístroje, je nutné průběžně provádět srovnávací zkoušky laboratorní metodou.

U 95 % vzorků by se výsledky neměly lišit o více než 0,5 %.

Stanovení podílu zadiny

Pro stanovení podílu zadiny, tzn. čistých semen, které propadly sítím o předepsané velikosti otvorů se u obilnin používá Steineckerovo prosévadlo. Rozměry sít jsou 430 mm x 150 mm (Obr. 25), délka otvorů je 20 mm (25 mm), šířka otvorů 1,5–2,5 mm podle druhu plodiny (Tab. 10).

Tab. 10 Velikosti otvorů pro síťové třídění obilnin

Druh	šíře otvoru síta v mm
pšenice ozimá, ječmen jarní	2,2
pšenice jarní, ječmen ozimý, tritikále	2,0
žito, oves pluchatý	1,8
oves nahý	1,5

Základní zkušební vzorek (120 g) se přesně zváží a prosévá na prosévadle po dobu 3 minut. Čistá semena, která propadla sítím, se zváží a spočítá se hmotnostní podíl zadiny vyjádřený v procentech z hmotnosti celého vzorku.



Obr. 25 Síta pro stanovení podílu zadiny

Praktické cvičení

Stanovte semenářskou hodnotu přiděleného vzorku zrna obilnin (pšenice, ječmen). Vzorek o hmotnosti 1 kg rozdělte pomocí dělidla vzorků tak, aby rozborový vzorek měl přibližně 120 g. Proved'te zkoušku čistoty a zjištěné údaje zapište do protokolu. Získaný podíl čistých semen pak použijte pro zkoušku klíčivosti a pro stanovení hmotnosti tisíce semen. Dále proved'te stanovení vlhkosti a podílu zadiny. Výsledky všech zkoušek zapište do tabulky 11.

Tab. 11 Formulář pro rozbor osiva obilnin

Zkouška čistoty			
Čistá semena: %	Neškodné nečistoty: %	Semena jiných rostlinných druhů: %	
Složení neškodných nečistot (vypsát):			
Jiné rostlinné druhy (vypsát):			
Přítomnost živočišných škůdců:			
Zkouška klíčivosti			
Klíčivá semena: %	Dormantní semena: %	Vadné klíčky: %	Mrtvá semena: %
1.			
2.			
3.			
4.			
Vlhkost: %			
HTS g			
Podíl zadiny: %			

Závěr: Výsledky rozboru porovnejte s požadovanými hodnotami pro zkoušený druh (viz

Tab. 12) a okomentujte.

Tab. 12 Požadavky na vlastnosti osiva u vybraných druhů obilnin podle vyhlášky
č. 129/2012 Sb.

Druh	Kategorie osiva	Vlhkost nejvýše (%)	Klíčivost nejméně (%)	Čistota nejméně (%)	Nejvyšší dovolený výskyt semen jiných druhů v dodatečném vzorku (počet/1 kg)				
					Celkem jiných druhů (ks)			Výskyt plevelných druhů (ks)	
					Celkem	Obilniny	Ostatní druhy	Ředkev ohnice koukol	Oves hluchý, fatuoidy, jilek mámivý
Pšenice	SE, E	15	85	99	8	2	6	2	0
	C	15	85	98	20	14	14	6	0
Žito	SE, E	15	85	98	8	2	6	2	0
	C	15	85	98	20	14	14	6	0
Tritikale	SE, E	15	80	98	8	2	6	2	0
	C	15	80	98	20	14	14	6	0
Ječmen	SE, E	15	85	99	8	2	6	2	0
	C	15	85	98	20	14	14	6	0
Oves	SE, E	15 (14)	85 (75)*	99	8	2	6	2	0
	C	15 (14)	85 (75)*	98	20	14	14	6	0
Podíl zadiny může dosahovat max. 3 %									

* údaj v závorce platí pro oves nahý

8.8 Testy na vitalitu osiva

Životnost (vitalitu) osiva lze definovat jako schopnost osiva rychle a vyrovnaně klíčit a vzházet za nepříznivých podmínek vnějšího prostředí a uchovat si klíčivost po dlouhodobém skladování. Osivo s vysokou klíčivostí může vykazovat nízkou vitalitu – výsledkem je nevyrovnaný porost. Zkoušky životnosti poskytují přesnější odhad kvality osiva v porovnání se standardní zkouškou klíčivosti.

Metody stanovení vitality doporučené ISTA:

- test konduktivity (Conductivity test)
- test urychleného stárnutí (Accelerated ageing test)

Ostatní metody stanovení vitality:

- chladový test
- test kontrolovaného stárnutí
- komplexní stresový test
- Hiltnerův test
- test rychlosti růstu klíčenců

Zkouška konduktivity

Test je určený pro zkoušení životnosti osiva luskovin. Princip testu spočívá v měření konduktivity (elektrické vodivosti) vody, v níž se máčel vzorek semen. Osivo z něhož se uvolní hodně elektrolytu a tedy vykazuje vysokou konduktivitu se považuje za málo vitální, naopak osivo s nízkou konduktivitou se považuje za vitální.

Provedení: u vzorku osiva se stanoví vlhkost, pokud neodpovídá rozmezí 10–14 %, upraví se podle potřeby. Ze vzorku se odpočítají čtyři opakování po 50 semenech a zváží se s přesností na dvě desetinná místa. Semena se vloží do baňky s deionizovanou vodou (250 ml) vytemperovanou na 20 ± 2 °C a baňky zakryté folií se nechají inkubovat v termostatu při 20 ± 2 °C po dobu 24 hod. Změří se vodivost výluhu a vodivost deionizované vody a provede výpočet podle následujícího vzorce. Pokud vodivost čisté deionizované vody přesáhne 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, je nutné vyčistit elektrodu.

$$\text{vodivost}(\mu\text{S} / \text{cm.g}) = \frac{\text{vodivost výluhu} - \text{vodivost deionizované vody}(\mu\text{S} / \text{cm})}{\text{hmotnost semen } \left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right)}$$

Pro vyhodnocení je možné použít údaje z tabulky 13.

Tab. 13 Hodnoty konduktivity ve vztahu k poškození semen

Poškození	Konduktivita
vitální osivo	< 25 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$
slabě poškozené osivo	25 - 29 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$
silně poškozené osivo	30 - 43 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$
osivo nevhodné pro setí	> 43 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$

Zkouška urychleného stárnutí (Accelerated ageing test)

Test je určený pro zkoušení životnosti osiva sóji, stárnutí probíhá za kontrolovaných podmínek (vyšší vlhkost a teplota). U zestárlých semen se provede test klíčivosti, semena s vysokou klíčivostí se považují za vitální.

Provedení: u vzorku semen se stanoví vlhkost, která by měla být mezi 10–14 %, a odebere se 42 g semen. Do speciální plastové krabice se přidá 40 ml destilované vody a odvážená semena se rozprostou na sítko vložené do krabice tak, aby nedošlo k jejich namočení. Krabice se uzavře víkem a umístí do termostatu. Stárnutí probíhá při teplotě $41 \pm 0,3$ °C po dobu 72 hod. Okamžitě po ukončení stárnutí se semena opět zvažují, jejich vlhkost by měla být v rozmezí 27–30 %. U vzorků s vyhovující vlhkostí se provede standardní test klíčivosti ve čtyřech opakováních po 50 semenech. Při vyhodnocení se porovná klíčivost semen před a po zestárnutí. Partie osiva, u kterých je zjištěn výrazný pokles klíčivosti, se označují jako málo vitální a lze u nich očekávat horší skladovatelnost a nízkou vzcházejivost v nepříznivých podmínkách.

Chladový test u kukuřice

Modifikovaná zkouška klíčivosti, kterou se ověří použitelnost partie osiva kukuřice pro raný výsev. Klíčivost semen je ovlivněna interakcí nižší teploty s půdními patogeny. Zkouší se pouze mořené osivo, obvykle 4 opakování po 50 semenech.

Provedení: Navlhčený filtrační papír o rozměrech 30 x 43 cm se položí na stůl. Na jeho levou polovinu se nasype slabá vrstva zeminy z kukuřičného pole (odběr na podzim, prosátá na sítě

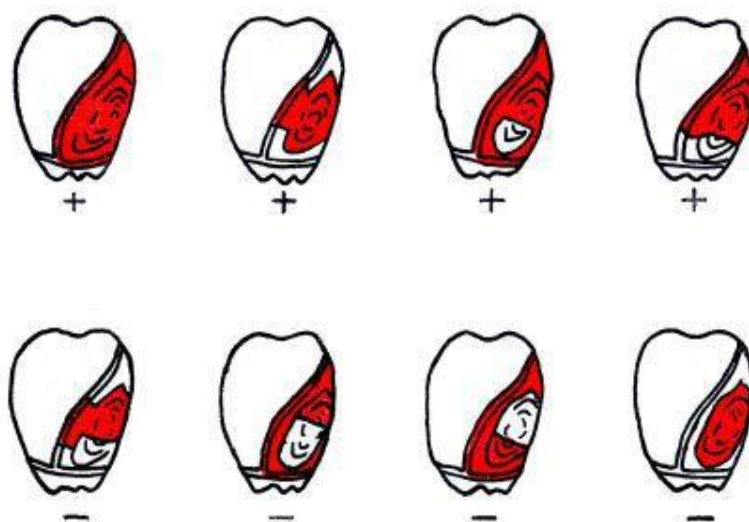
s otvory 3 mm, uskladněná ve vlhku a chladu), do které se uloží semena do řady tak, aby klíčky byly stejně uspořádány a po svinutí a postavení roličky směřovaly dolů. Semena se zasypou další zeminou, k lůžku se přiloží bavlněný knot a celý papír se svine do roličky. Roličky se uloží ve vlhku při teplotě 6 °C po dobu 10 dnů a pak při teplotě 23–25 °C po dobu dalších 5 dnů. Vyhodnocení se provádí podobně jako u klíčivosti, hodnotí se počet klíčenců a normalita jejich vývoje.

Biochemická zkouška životaschopnosti semen

Metoda umožňuje rychlý odhad životaschopnosti osiva, používá se přednostně pro druhy pomalu klíčící, případně u semen vykazujících dormanci. Lze použít jako doplňující zkoušku u svěžích nevyklíčených semen po ukončení zkoušky klíčivosti.

Metoda je založená na detekci redukčních pochodů v živých pletivech. Vodík odštěpený dehydrogenázami reaguje s vodným roztokem 2, 3, 5-trifenylnitrotetrazolium chloridu (TTC) nebo bromidu za vzniku červeně zbarveného trifenylformazanu. Odumřelá nebo poškozená pletiva zůstanou nezabarvena. Test se provádí na 2 x 100 semenech, která se předem navlhčí a pak se rozříznou, nebo se vypreparují embrya. Připravená semena nebo embrya se vloží do roztoku TTC po dobu několika hodin a podle rozsahu výsledného zbarvení se hodnotí jejich životaschopnost.

Provedení testu u kukuřice: Zrna se máčejí ve vodě teplé 30 °C po dobu 18 hodin. Zbobotnalá zrna se rozříznou podélně přesně v polovině embrya a vloží do 1% roztoku TTC. Barvení probíhá bez přístupu světla, při teplotě 30 °C. Po 2 hodinách inkubace se posoudí zbarvení řezné plochy (Obr. 26), v případě nedostatečného vybarvení lze dobu prodloužit.



Obr. 26 Tetrazoliový test u kukuřice

Životaschopná semena:

- embrya a štítky jsou zcela zbarvené,
- embrya jsou zcela zbarvené, ze štítku zbarvena část související s embryem,
- embrya jsou zbarvená s výjimkou špičky a pochvy hlavního kořínku.

Výsledek: V jednotlivých opakováních se určí počet životaschopných semen, rozdíl mezi opakováními nesmí přesáhnout stanovenou míru tolerance (viz zkouška klíčivosti). Výsledná průměrná hodnota se uvádí v procentech, zaokrouhlená na celé číslo.

8.9 Pravost druhu a odrůdy

Druhov a odrůdová pravost a čistota se standardně kontroluje pouze za předpokladu, že je to možné zjistit podle vzhledu semen. Pokud identifikace vyžaduje zvláštní zkoušku, provádí se na žádost zasilatele vzorku. Zkouší se obvykle semena, klíčenci nebo dlouhodoběji pěstované rostliny.

Ke zkoušce se obvykle použije dodatečný vzorek, u velkosemenných druhů 500 g (ISTA 1 kg, hrách, kukuřice, soja), obilniny 500 g, řepa 200 g (ISTA 250 g), ostatní 50 –100 g.

Metody použitelné pro odlišení druhů a odrůd:

1. mikroskopické,
2. fluorescenční,
3. chemické,
4. cytologické,
5. vegetační.

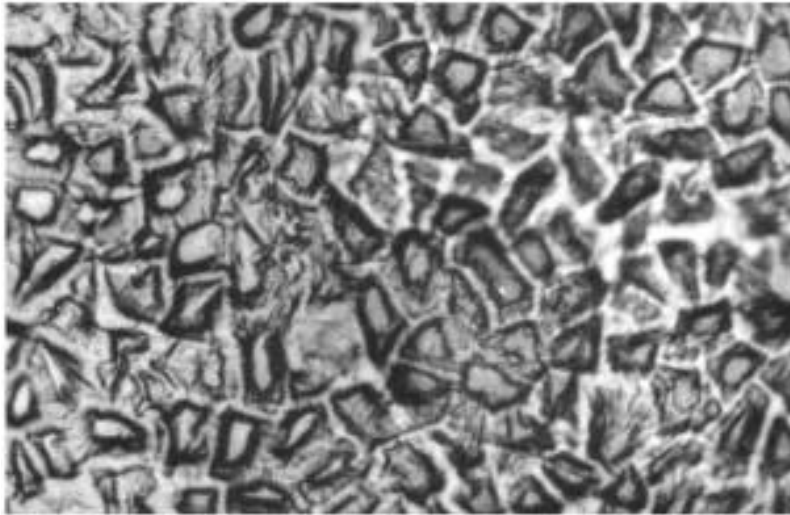
Mikroskopické metody

Rozlišování krmných košťálovin od řepky olejné mikroreliefovou zkouškou – zkouška je založena na rozdílné povrchové retikulaci brukvovitých semen. Obvykle se zkouší 50 náhodně vybraných (podezřelých) semen. Semena se na podložním skle dokonale obalí bezbarvým lakem ředěným acetonem v poměru 1:2 a nechají se oschnout. povrchová struktura semene se obtiskne do blanky laku. Nalakovaná semena se přenesou na průhlednou lepící pásku a s pomocí preparační jehly se zvolna překulují napříč páskou tak, aby se vrstva laku strhla. Lepící páska se přitiskne na podložní sklo a mikroskopuje při 200x zvětšení.

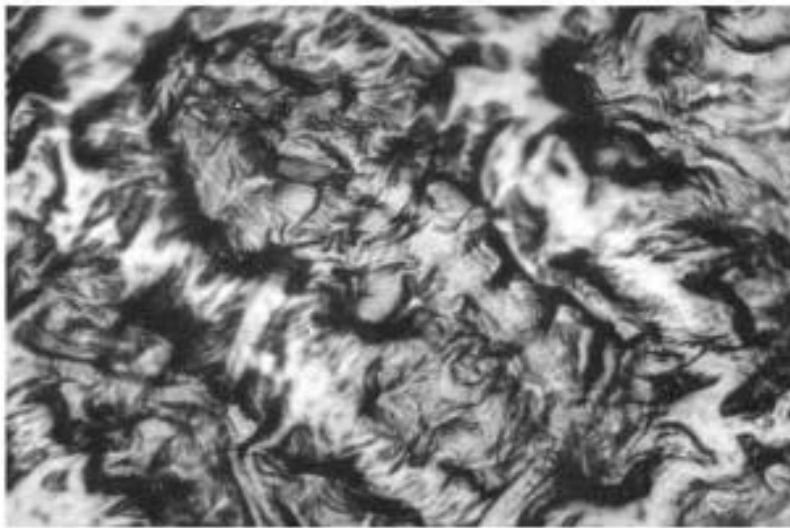
Řepka vykazuje pravidelnou mozaiku s oky cca 0,02 mm dlouhými a 0,015 mm širokými.

Kapusta tvoří nepravidelná oka o délce 0,6 mm a šířce 0,05 mm. Uvnitř ok jsou patrné drobné čárkovité struktury.

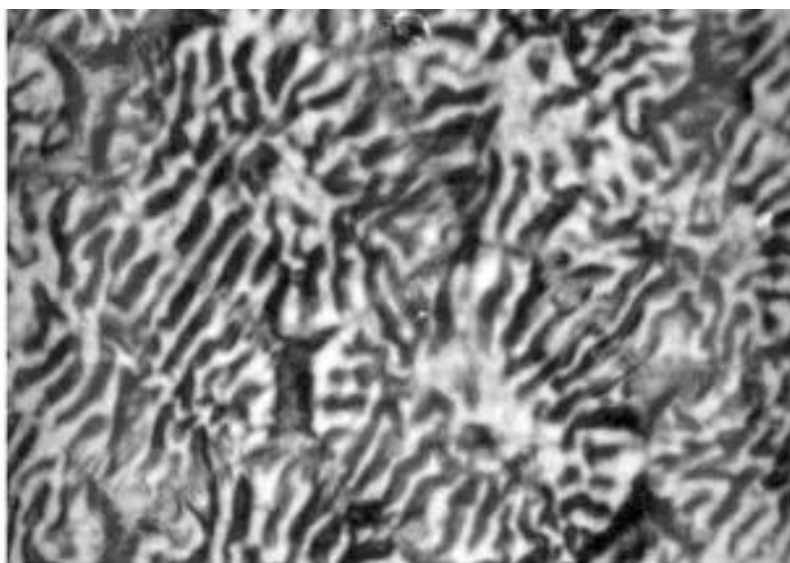
Hořčice rolní tvoří oka nepravidelná, retikulace je méně výrazná.



Řepka



Kapusta



Hořčice rolní

Rozlišování hrachu dřevňového a kulatosemenného podle tvaru škrobových zrn – z děloh zkoušených semen se do kapky vody na podložním skle naškrábe trochu pletiva. Tvar škrobových zrn se zjišťuje mikroskopicky při 200–400x zvětšení. Škrobová zrna hrachu polního jsou elipsovitá, uprostřed s jednoduchou podélnou puklinou. Škrobová zrna hrachu dřevňového jsou kulatá a praskají radiálně.

Fluorescenční metody

Pro rozlišení se používá fluorescenční lampa.

Rozlišení bělosemenného a žlutosemenného ovsa – pluchy a plušky bílého ovsa fluoreskují namodrale až nažloutle, žlutý oves nefluoreskuje.

Rozlišování hrachu setého od pelušky fluorescencí – suchá semena hrachu setého fluoreskují modravě nebo růžově, semena pelušky zůstávají tmavá. Zkoušejí se sporná semena.

Rozlišení vikve plochosemenné od čočky – u zkoušených semen se na ploché straně naruší osemení. Pod křemíkovou lampou fluoreskují dělohy čočky jasně zeleně, dělohy vikve plochosemenné jemně růžově až oranžově.

Rozlišení vikve seté od panonské – pod křemíkovou lampou fluoreskují dělohy vikve seté jemně růžově až oranžově, dělohy vikve panonské jemně modrozeleně.

Rozlišení vikve huňaté od vikve panonské – semena se nechají vyklíčit mezi filtračním papírem za přítomnosti světla. Po 6–7 dnech vykazují klíčenci specifickou fluorescenci.

Vikev huňatá – epikotyl na bázi korálově oranžový, směrem k lístkům slabě zelenající, kořínky bezbarvé,

Vikev panonská – epikotyl špinavě šedý, k lístkům tmavě zelenající, kořínky šedé.

Rozlišení hořčice rolní v řepce oleje fluorescencí – dva zkušební vzorky po 10 g se prosejí sítem s kruhovými otvory 1,8 mm. Semena, která propadla sítem (hořčice) se rozloží do Petriho misky s filtračním papírem nasáklým 8% roztokem NaOH nebo KOH. Zakryté misky se inkubují 40–90 min při laboratorní teplotě. Okolí semen hořčice rolní fluoreskuje svítivě zeleně, kolem ostatních brukvovitých papír nefluoreskuje (někdy matně modře kolem poškozených semen).

Chemické metody

Pro ověřování pravosti odrůd pšenice, ječmene a ovsa se používá standardní referenční metoda pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy. Zásobní bílkoviny (gliadiny, hordeiny, aveniny) rozpustné v alkoholu se vyextrahují z endospermu obilek a separují na polyakrylamidovém gelu. Elektroforeogramy lze použít pro ověření pravosti odrůdy nebo pro stanovení příměsí jiných odrůd. Vyhodnocení se provádí srovnáním proteinového spektra vzorku se spektrem standardní referenční odrůdy. Posuzuje se počet bílkovinných zón (proužků), jejich vzájemná poloha a intenzita zbarvení. Pro ověření odrůdové čistoty je nutné hodnotit minimálně 100 semen, pro ověření pravosti odrůdy minimálně 10 semen.

Zjišťování přítomnosti hořkých látek v semenech lupiny pomocí Lugolova roztoku. Semena lupiny se namočí do vody po dobu 24 hodin. Z nabobtnalých semen se ukrojí tenký plátek, který se umístí na skleněnou tabulku podloženou bílým papírem a zakápně Lugolovým roztokem. Za přítomnosti hořkých látek se vytvoří hnědočervená sraženina. Zkoušku lze provést také na rozpůlených semenech, roztok se aplikuje na řeznou plochu. Hořkost lupiny souvisí s vysokým obsahem alkaloidů.

Cytologické metody

Tyto metody jsou zaměřeny na stanovení stupně ploidie u druhů, u kterých se vyskytují odrůdy s odlišnou ploidií, např. jetel luční, jetel zvrhlý, řepa, tritikále a některé trávy. Počet chromozomů se hodnotí v upravených a obarvených meristémeh kořenových špiček získaných z klíčících rostlin.

Vegetační metody

Rozlišení cukrovky, krmné a salátové řepy podle barvy hypokotylu – ze vzorku semen se odpočítá 2 x 50 semen, která se vysejí do vlhkého písku a nechají klíčit při laboratorní teplotě. Po sedmi dnech se klíčenci vyberou z lůžka, operou a hodnotí podle zbarvení jednotlivých částí.

Cukrovky a bílé polocukrovky – hypokotyl je světle růžový nebo nazelenalý, báze bílá.

Krmné řepy – hypokotyl nažloutlý až žlutý, sytě žlutý nebo růžový, báze zbarvena intenzivněji.

Salátové řepy – celý hypokotyl je karmínově červený.

Rozlišování jarních a ozimých forem obilnin – semena zkoušeného vzorku se vysejí do nádob ve skleníku v takovém počtu, aby vyrostlo alespoň 100 rostlin. U rostlin jarních forem probíhá během kultivace generativní vývoj, ozimé formy setrvávají ve vegetativní fázi. Po 14 dnech lze odlišit jarní formy podle diferenciacce vegetačního vrcholu, po 21–28 dnech lze již rozeznat 1–3 kolénka a protažená internodia. Ozimé formy tvoří pouze listy, bez náznaku sloupkování. Zkoušku lze urychlit průběžným rozprašováním slabého roztoku kyseliny giberelové (0,001 g.l⁻¹) na listy zkoušených rostlin.

Rostlinné klasifikátory

Pro přesné popisy jednotlivých druhů se používají klasifikátory. České klasifikátory používané pro hodnocení kolekcí rostlin uchovávaných v genové bance je možné najít na stránkách <http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/>. Při registraci odrůd se používají mezinárodní klasifikátory UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). Tyto klasifikátory byly vypracovány pro všechny významné polní, zahradní, ovocné a okrasné druhy a slouží k identifikaci jednotlivých odrůd a ke stanovení odlišností v rámci DUS testů (http://www.upov.int/test_guidelines/en/).

Jednotlivé odrůdy se zkouší v polních podmínkách, pro tyto účely se zakládají speciální pokusy. Některé znaky se hodnotí během vegetace, další až po sklizni. Pro každý znak jsou stanoveny jednotlivé kategorie, ke kterým jsou přiřazeny kontrolní odrůdy s typickým projevem.

Praktické cvičení: Podle klasifikátoru UPOV proveďte hodnocení dvou odrůd ječmene.

Zjištěné údaje запиšte do tabulky 14.

Tab. 14 Morfologický popis odrůdy podle klasifikátoru UPOV

(Ječmen – *Hordeum vulgare* L. *sensu lato*)

UPOV	Znak (Character)	Odrůda (Variety)		Odrůda (Variety)	
		slovně	body	slovně	body
11					
13					
14					
15					
16					
17					
19					
20					
21					
22					
23					
25					
26					
27					

Závěr: Popište, ve kterých znacích se posuzované odrůdy liší.

8.10 Produkce a kontrola sadbových brambor

Produkce sadbových brambor a kontrola jejich kvality vykazují určitá specifika v porovnání s ostatními plodinami. Povolené kategorie rozmnožovacího materiálu jsou uvedeny v tabulce 15.

Tab. 15 Kategorie rozmnožovacího materiálu u brambor

Kategorie rozmnožovacího materiálu		Symbol	Uznávací řízení	Barva návěšky
Šlechtitelský (výchozí materiál)			ne*	fialová
Předstupně	Superelita	SE 1 SE 2	ne*	bílá s fialovým příčným pruhem
Základní	Elita	E 1 E 2 E 3	ano	bílá
Certifikovaný	1. generace 2. generace	A B	ano ano	modrá modrá

* v případě, že sadba není uváděna do oběhu nebo využita pro výrobu certifikovaného materiálu

Uznaná sadba brambor v kategorii SE a E může být produkována pouze v uzavřených pěstebních oblastech. Tyto oblasti jsou legislativně vymezeny zákonem č. 219/2003 Sb. Na množitelském pozemku se nesmí vyskytovat karanténní organizmy, průzkum na výskyt háďátek se provádí před výsadbou.

Karanténní organismy bramboru:

- rakovina bramboru (*Synchytrium endobioticum*),
- háďátka bramborové (*Globodera rostochiensis* a *G. pallida*),
- bakteriózy:
 - bakteriální kroužkovitost bramboru (*Clavibacter michiganensis*),
 - bakteriální hnědá hniloba (*Ralstonia solanacearum*),
- virózy, viroidy a mykoplazmózy nevyskytující se v Evropě.

Množitelské porosty se kontrolují ve třech termínech (Tab. 16). U porostů se sleduje především výskyt virózních rostlin, jsou stanoveny izolační vzdálenosti od jiných porostů brambor s výskytem symptomů virových chorob nad 10 %, které jsou u předstupňů 500 m, u základního rozmnožovacího materiálu 300 m a u certifikovaného materiálu 100 m. V případě

selekce rostlin se symptomy virového onemocnění je nutné tyto rostliny beze zbytku odstranit z pozemku. U všech množitelských kategorií, s výjimkou certifikované sadby druhé generace (B), je nařízeno předčasné ukončení vegetace, které musí být provedeno tak, aby rostliny znovu neobrostly. Sadbové brambory je možné na stejném pozemku pěstovat nejdříve za 3 roky po předchozím porostu brambor.

Tab. 16 Počet a termíny přehlídek

přehlídka			množení po bramborách
1	2	3	
při průměrné výšce trsnů 20 cm	v plné vegetaci	po předčasném ukončení vegetace	3 roky

Kvalita sadbových hlíz se ověřuje mechanickým rozborem (Tab. 17) a posklizňovou zkouškou (zdravotní stav).

Pro mechanický rozbor se odebírá jeden průměrný vzorek na 20 tun sadby. Hlízy se odebírají ručně tak, aby vzorek reprezentoval průměrný stav sadby, včetně nečistot. Pro posklizňovou zkoušku se odebírají dva samostatné vzorky po 11 hlízách z deseti různých míst, celkem 2 x 110 hlíz.

Hlízy pro posklizňové a vegetační zkoušky se mohou odebírat také z porostu, nejdříve týden po předčasném ukončení vegetace v množství 2 x 110 hlíz z 10 ha porostu.

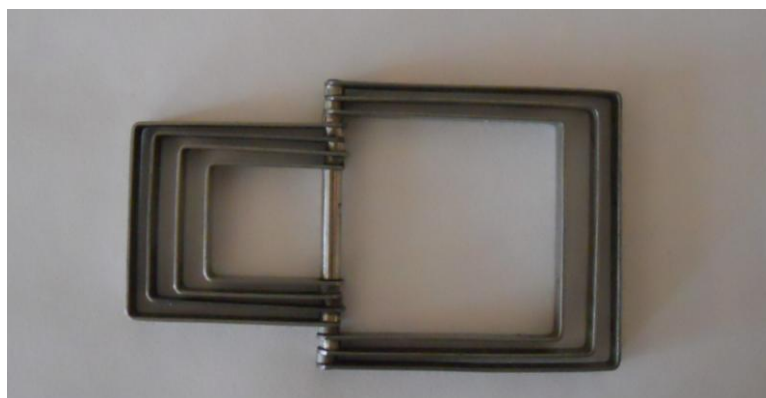
Mechanický rozbor vzorku hlíz:

- převážení vzorku, zkušební vzorek o hmotnosti 25 kg,
- posouzení celkového stavu hlíz,
- stanovení čisté hmotnosti sadby, obsah hrubých nečistot se zjistí vytříděním a zvážením všech příměsí, v případě vysokého znečištění hlíz zeminou se provede prací zkouška,
- posouzení pravosti a čistoty odrůdy podle vzhledu a barvy hlíz na povrchu a na řezu,
- posouzení vad na povrchu hlíz,
- posouzení vad na řezu,
- kontrola velikostního třídění, stanovení vyrovnanosti hlíz.

Tab. 17 Vady hlíz sadbových brambor

Vady zjišťované na povrchu hlíz		
K	Rakovina brambor	bradavičnaté nádorky v úžlabí oček
1	Hlízy jiných odrůd	
2	Hlízy poškozené	1. zmrzlé 2. nachlazené (mrazová nekróza) 3. zapařené – sesychající, s tmavou dužninou
3	Mokrý hniloba	1. <i>Erwinia carotovora</i> (zapáchající, mokvající) 2. <i>Pythium ultimum</i> – měkká hniloba, bez zápachu
4	Suchá hniloba	<i>Fusarium</i> , <i>Phoma</i> – tmavé skvrny na slupce, tvoří se dutiny
5	Plíseň bramborová	doplňková zkouška
6	Hlízy mechanicky poškozené	poškození při sklizni, škůdci, oddenky plevelů, hloubka nad 5 mm,
7	Strupovitost	při výskytu nad 1/3 povrchu hlízy
8	Vločkovitost	při výskytu nad 10 % povrchu hlízy
Vady zjišťované na řezu hlíz		
K	Bakteriální kroužkovitost dužniny	<i>Corynebacterium sepedonicum</i> – při stlačení řezu vytéká z cévních svazků sliz
9	Silné šednutí až černání dužniny	zapaření, potlučení, mráz – víc než 1/3 hlízy
10	Silná rzivost dužniny	fyziologická nebo virového původu
Ostatní vady		
11	Příměs zeminy	do 2 % hmotnosti vzorku
12	Hlízy podsadbové	do 3 % hmotnosti vzorku
13	Hlízy nadsadbové	do 3 % hmotnosti vzorku

Velikost sadby se stanovuje tříděním na čtvercových sítích o minimálním rozměru 25 x 25 mm a maximálním rozměru 60 x 60 mm. Hlízy, které propadnou nejmenším sítím, se označují jako podsadbové a hlízy, které nepropadnou největším sítím, se označují jako nadsadbové (Obr. 27). Maximální rozdíl ve velikosti hlíz jedné partie by měl být 25 mm.



Obr. 27 Šablona pro kontrolu velikosti hlíz

Kvalita sadby se posuzuje podle výskytu a závažnosti vad (viz Tab. 18).

Tab. 18 Požadavky na vlastnosti sadby brambor

Skupina vad	Vada	Nejvyšší přípustné hmotnostní % jednotlivé vady	Nejvyšší přípustné hmotnostní % skupiny
I.	karanténní organismy	nesmí se vyskytovat	
II.	mokrý hniloby	0,25	1
	suchá hniloba	1	
III.	plíseň bramborová	1	1
IV.	aktinomycetová strupovitost	5	6
	vločkovitost hlíz	5	
V.	mechanické poškození, poškození škůdci, zapařením, mrazem	3	3
celkem II.-V.			6
VI.	šednutí až černání dužiny	10	
	rzivost dužiny	10	

U hlíz se dále hodnotí výskyt viróz metodou ELISA.

Tab. 19 Požadavky na zdravotní stav hlíz

	Šlechtitelský materiál	SE 1	SE 2	E			C	
				E 1	E 2	E 3	A	B
% procento hlíz napadených viry	0	1	2	2	4	4	10 5*	10
karanténní organismy	nesmí se vyskytovat (+viry a viroidy nevyskytující se v Evropě)							

* limit pro použití na produkci certifikovaného materiálu druhé generace (B)

Hlízy napadené těžkou virózou se počítají jako 1 %, počet hlíz s lehkou virózou se násobí koeficientem 0,33 a hlízy napadené S virózou koeficientem 0,05 (Tab. 19).

(Původci těžkých viróz: virová svinutka brambor, A virus, Y virus; původci lehkých viróz: M virus, X virus, S virus).

Doplňkové zkoušky sadby bramboru

Zkoušky se provádí v případě poškozených hlíz v korunkové části, u sadby pomrzlé, nastydlé, zapařené a pro doplňkové stanovení odrůdové pravosti.

Zkouška klíčivosti

Zkouška klíčivosti hlíz se provádí při podezření na sníženou vitalitu sadby, u sadby pomrzlé, nastydlé, zapařené, uložené v teple apod. Laboratorní vzorek se připraví odběrem 100 hlíz ze souhrnného vzorku. Hlízy se uloží na lísky korunkovou částí nahoru a umístí do zatemněné místnosti při teplotě 15–20 °C a vzdušné vlhkosti 90 %. Každý druhý den se hlízy rosí vodou. Za 28 dnů se hodnotí klíčivost, klíčky by měly dosáhnout délky 1–2 cm. Za hlízy nevhodné k sázení se považují ty, které nevytvořily více jak 2 odpovídající klíčky. K vadným hlízám se počítají ty, které vytvořily klíčky zasychající, zahnívající, zahnědlé se zčernalými vrcholy, silně větvící nebo nitkovité a hlízy hlízkující. Při hodnocení se vyčíslí množství klíčivých, abnormálně klíčivých a neklíčivých hlíz v %. Sadbové brambory by měly dosáhnout minimálně s 95% klíčivosti.

Hodnocení odrůdové čistoty

Odrůdová pravost a čistota se hodnotí podle tvaru hlízy, barvy a charakteru slupky, barvy a tvaru oček a barvy a struktury dužniny. Pro doplňkové určení odrůdy se hlízy nechají narašit ve světlé místnosti při pokojové teplotě 20–25 °C. Po 10 dnech se hodnotí vzhled klíčků na jednotlivých hlízách. Procento odrůdové pravosti se vypočítává pouze z hlíz, které byly posouzeny jako klíčivé. Pro ověřování pravosti odrůd brambor byla vypracována standardní referenční metoda pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (UPOV).

Praktické cvičení: Proveďte mechanický rozbor vzorku brambor.

Materiál a pomůcky:

- vzorky hlíz brambor,
- váhy,
- čtvercové měřidlo o rozměrech 25 x25 mm až 60 x 60 mm,
- nůž,
- prkénko,
- nádoba na oprání hlíz.

Zvážený vzorek hlíz rozdělte do skupin podle jednotlivých vad (Tab. 17) a stanovte procentické podíly z celkové hmotnosti. Výsledky запиšte do protokolu.

Protokol pro mechanický rozbor sadby brambor

Číslo vady	Druh vady	%
1.	hlízy jiných odrůd	
2.	hlízy poškozené mrazem a zapařením	
3.	mokrý hniloba	
4.	suchá hniloba – způsobená <i>Fusarium</i> spp., popř. <i>Phoma</i> spp.	
5.	plíseň bramborová <i>Phytophthora infestans</i>	
6.	hlízy poškozené mechanicky nebo škůdci	
7.	strupovitost <i>Streptomyces scabies</i>	
8.	vločkovitost <i>Rhizoctonia solani</i>	
9.	silné šednutí až černání dužiny zaujímající více než 1/3 řezu hlízy	
10.	silná rzivost dužiny zaujímající více než 1/10 řezu hlízy	
11.	příměs zeminy a jiných nečistot	
12.	hlízy podsadbové	
13.	hlízy nadsadbové	
K	hlízy napadené karanténními organizmy	

Závěr: Zjištěné hodnoty porovnejte s požadavky uvedenými v tabulce 18 a okomentujte.

Kritické hodnoty Studentova t-rozdělení

Stupně volnosti (df)	α pro dvoustranný test	
	0,05	0,01
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
11	2,201	3,106
12	2,179	3,055
13	2,160	3,012
14	2,145	2,977
15	2,131	2,947
16	2,120	2,921
17	2,110	2,898
18	2,101	2,878
19	2,093	2,861
20	2,086	2,845
21	2,080	2,831
22	2,074	2,819
23	2,069	2,807
24	2,064	2,797
25	2,060	2,787
26	2,056	2,779
27	2,052	2,771
28	2,048	2,763
29	2,045	2,756
30	2,042	2,750
40	2,021	2,704
50	2,009	2,678
60	2,000	2,660
80	1,990	2,639
100	1,984	2,626
120	1,980	2,617

Kritické hodnoty pro Pearsonův korelační koeficient

počet jedinců n	α pro dvoustranný test	
	0,05	0,01
5	0,878	0,959
6	0,811	0,917
7	0,754	0,875
8	0,707	0,834
9	0,666	0,798
10	0,632	0,765
11	0,602	0,735
12	0,576	0,708
13	0,553	0,684
14	0,532	0,661
15	0,514	0,641
16	0,497	0,623
17	0,482	0,606
18	0,468	0,590
19	0,456	0,575
20	0,444	0,561
21	0,433	0,549
22	0,423	0,537
23	0,413	0,526
24	0,404	0,515
25	0,396	0,505
26	0,388	0,496
27	0,381	0,487
28	0,374	0,479
29	0,367	0,471
30	0,361	0,463
40	0,312	0,403
50	0,279	0,361
60	0,254	0,330
80	0,220	0,286
100	0,197	0,256
120	0,179	0,234

Provozní řád biotechnologického pracoviště

Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Úvod

Tento místní provozní řád pracoviště stanoví podmínky pro provoz v režimu uzavřeného nakládání s GMO I. kategorie rizika.

Technicko organizační opatření.

- Vstup do laboratoře musí být označen podle povahy práce výstražnými tabulkami (podle ČSN).
- Zařízení, přístroje a nářadí musí být udržovány v provozuschopném a bezpečném stavu.
- Únikové a manipulační prostory, uzávěry vody, plynu a elektrického proudu musí být trvale volné.
- **Laboratorní nádobí se nesmí používat při jídle, pití a k přechovávání potravin.**
- Potraviny a nápoje, určené pro konzumaci, nesmějí být ukládány do chladniček určených pro přechovávání chemických látek a biologického materiálu.
- **V laboratořích je zakázáno jíst, pít a kouřit.**
- Každá laboratoř musí být označena.
- **Při laboratorních pracích musí být učiněna opatření odpovídající nebezpečí, které je možno předpokládat na základě vlastností a množství použitých látek a materiálu.**
- **Práce s těkavými chemickými látkami musí být prováděny v digestoři.**
- **Je zakázáno používat nevhodné nebo poškozené přístroje, nářadí a laboratorní nádobí.** Poškozené nádobí se vyřadí.
- **Při práci v laboratoři je třeba používat pečlivě sestavené aparatury. Vadné sklo nesmí být používáno.**
- Je zakázáno dávat k mytí nádobí, které je znečištěno silnými kyselinami nebo zásadami, látkami jedovatými, dráždivými nebo látkami, které se vodou prudce rozkládají.
- Jedy, žíraviny, hořlavé kapaliny a chemické karcinogeny musí být označeny podle předpisů a musí být s nimi také podle těchto předpisů zacházeno.
- Před každou prací s látkami, které mohou ohrozit zdraví, musí být pečlivě zkontrolována technická i organizační opatření k ochraně zdraví a současně musí být připraveny asanační prostředky pro případ havárie.

- Jedy musí být uchovány tak, aby nemohlo dojít k jejich zneužití, a musí být zamčeny.
- Je zakázáno nasávat jedy a žíraviny do pipet ústy. Musí být používány bezpečnostní pipety nebo se musí nasávat prostřednictvím vakua.
- Při destilaci hořlavých kapalin je zakázáno ponechat aparaturu bez dozoru. Při použití vodního chlazení se musí kontrolovat přívod vody do chladiče.
- Při rozlití hořlavých kapalin se musí v místnosti okamžitě zhasnout plynové spotřebiče (i karmy), vypnout elektrický proud, vyhlásit zákaz vstupu nepovolaným osobám a zajistit dostatečné větrání.
- Rozlitá hořlavá kapalina se nechá vsáknout do vhodného porézního materiálu, který musí být odklizen na bezpečné místo. Rozlitá nepolární rozpouštědla je zakázáno roztírat na podlaze nebo na podložce z umělých hmot (nebezpečí výboje statické elektřiny).
- Se všemi odpady musí být nakládáno dle zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech ve znění zákona 188/2004 Sb., dle vyhlášky 503/2004 Sb.
- Střeby a odpad s ostrými hranami musí být ukládány do zvláštní nádoby.
- V laboratoři mohou být umístěny jen láhve s technickými plyny, které jsou pro provoz nezbytné. Proti pádu musí být láhve zajištěny v horní polovině láhve třmeny nebo řetízky nebo musí být umístěny ve stabilních nebo pojízdných stojanech. Dveře místnosti, v níž jsou láhve se stlačenými a jinými plyny, musí být označeny tabulkou podle ČSN.
- Před zahájením práce s technickými plyny musí být zajištěna větratelnost, připraveny vhodné ochranné, hasební a asanační prostředky, překontrolováno těsnění a funkce redukčních ventilů a těsnění aparatur.
- Při práci s technickými plyny je zakázáno:
 - používat láhve, u nichž prošla lhůta periodické zkoušky nebo poškozené láhve,
 - používat nevhodné nebo poškozené redukční ventily,
 - při otevírání a zavírání ventilu používat hrubé násilí nebo nevhodné nástroje,
 - používat láhve k jiným účelům nebo na jiné plyny, než pro které jsou určeny,
 - láhve a ventily opravovat nebo měnit jejich označení.
- Při úniku plynných paliv musí být uzavřen přívod plynu a vypnut elektrický proud. Vně ohroženého prostoru je vyhlášen zákaz kouření, zabráněno vstupu nepovolaným osobám a pracoviště je vyvětráno.

Autor	Dr. Ing. Pavlína Smutná RNDr. Ludmila Holková, Ph.D.
Název titulu	ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN A SEMENÁŘSTVÍ – NÁVODY DO CVIČENÍ
Vydavatel	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno
Vydání	První, 2014
Náklad	200 ks
Počet stran	128
Tisk	ASTRON studio CZ, a.s.; Veselská 699, 199 00 Praha 9 Neprošlo jazykovou úpravou.

Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ