

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vytvorenie platformy pre rýchlu identifikáciu
medzidruhových krížencov tráv.**

Diplomová práca

Bc. Andrea Sláviková

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Molekulárna a bunková biológia

Forma štúdia: Prezenčná

Olomouc 2014

Školiteľ: RNDr. David Kopecký, Ph.D.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Andrea Sláviková

Název práce: Vytvorenie platformy pre rýchlu identifikáciu medzidruhových krížencov tráv.

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Ústav experimentální botaniky, AV ČR, Olomouc

Vedoucí práce: RNDr. David Kopecký, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt: Trávy s čeľade *Poaceae* sú hojne využívané ako kvalitné krmivo pre hospodárske zvieratá a používajú sa aj na výsadbu trávnikov, okrasné účely a hrajú zásadnú úlohu v ochrane životného prostredia. Medzi najvyužívanejšie rody patrí kostrava a mätonoh vďaka ich hospodársky významným vlastnostiam. Tieto vlastnosti kombinuje ich kríženec *Festulolium*: toleranciu na biotický a abiotický stres z kostravy a výnosnosť mätonohu. V súčasnej dobe sa *Festulolium* komerčne používa a na trhu sa objavuje veľké množstvo odrôd tohto kríženca. Avšak genómová konštitúcia týchto odrôd je veľmi premenlivá a často sa líši v rámci jednej odrody. Táto práca je zameraná na identifikáciu markerov pre rýchlu a jednoduchú identifikáciu medzidruhových krížencov tráv, aby boli dostupné v šľachtiteľských staniciach. Prvá časť tejto práce opisuje dôležité informácie o hospodársky významných druhoch kostravy a mätonohu a ich medzidruhových krížencoch. Pozornosť je venovaná metódam použitých pre identifikáciu a charakterizáciu genómového zloženia *Festulolium*. Ďalej v práci nasleduje popis laboratórnej práce. Navrhla som 60 párov primerov z dostupných sekvencií DArT markerov a ich druhovú špecifickosť som overila v rámci 36 odrôd *Festuca* a *Lolium* pomocou metódy PCR. Našla som dva primery špecifické pre rod *Lolium*, ktoré by mohli byť použité na identifikáciu prvej generácie krížencov *Festulolium*. Produkty u 6 vybraných párov primerov boli osekvenované u dvoch diploidných odrôd za účelom identifikácie SNP markerov pomocou HRM metódy.

Klíčová slova: DArT markery, kostrava, mätonoh, *Festulolium*, PCR amplifikácia

Počet strán: 64

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Andrea Sláviková

Title: Platform development for rapid identification of intergeneric grass hybrids.

Type of thesis: master

Department: Institute of Experimental Botany, Olomouc

Supervisor: RNDr. David Kopecký, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract: Grasses from Poaceae family are widely used as high quality feed for livestock and are also used for lawns and ornamental and play an essential role in protecting of environment. The most common genera include fescues and ryegrasses due to their agricultural features. Moreover, high yield and nutrition characteristics of ryegrasses and tolerance to biotic and abiotic stresses of fescues can be combined by intergeneric hybridization. Number of Festulolium (*Festuca* x *Lolium*) cultivars has been developed in several breeding stations and are of increasing popularity among farmers. However, their genomic constitution is highly variable within and among cultivars. This study aims to identify markers for quick and easy identification of interspecific grass hybrids, so that they are employable in breeding stations. The first part of this thesis describes the most agriculturally important members of fescues and ryegrasses and their hybrids. Attention is paid to the methods used for identification and characterization of genomic composition of Festulolium. It is followed by the description of practical lab work. I designed 60 primer pairs from available sequences of DArT markers and verify their species-specificity within 85 cultivars of *Festuca* and *Lolium* by the PCR method. I found two markers which are *Lolium*-specific and can be lately used for identification of *Lolium* genome in first generations of Festulolium hybrids. Moreover, products from 6 primer pairs were sequenced in two diploid varieties to identify SNP markers by HRM method.

Keywords: DArT markers, fescue, regrass, Festulolium, PCR amplification

Number of pages: 64

Number of appendices: 0

Language: slovak

Čestne prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne počas magisterského štúdia pod odborným vedením RNDr. Davida Kopeckého, Ph.D., Mgr. Štěpána Stočesa a s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Rada by som sa poďakovala všetkým tým, ktorí mi pomohli pri realizácii mojej diplomovej práce, konkrétne môjmu školiteľovi RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D., doktorantovi Mgr. Štěpánu Stočesovi za veľkú pomoc pri práci v laboratóriu a ostatným pracovníkom laboratórií Centra štruktúrnej a funkčnej genomiky rastlín Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR, v. v. i. v Olomouci.

Súhrn

Trávy s čeľade *Poaceae* sú hojne využívané ako kvalitné krmivo pre hospodárske zvieratá a používajú sa aj na výsadbu trávnikov, okrasné účely a hrajú zásadnú úlohu v ochrane životného prostredia. Medzi najvyužívanejšie rody patrí kostrava a mätonoh vďaka ich hospodársky významným vlastnostiam. Tieto vlastnosti kombinuje ich kríženec *Festulolium*: toleranciu na biotický a abiotický stres z kostravy a výnosnosť mätonohu. V súčasnej dobe sa *Festulolium* komerčne používa a na trhu sa objavuje veľké množstvo odrôd tohto kríženca. Avšak genómová konštitúcia týchto odrôd je veľmi premenlivá a často sa líši v rámci jednej odrody. Táto práca je zameraná na identifikáciu markerov pre rýchlu a jednoduchú identifikáciu medzidruhových krížencov tráv, aby boli dostupné v šľachtiteľských staniach.

Prvá časť tejto práce opisuje dôležité informácie o hospodársky významných druhoch kostravy a mätonohu a ich medzidruhových krížencoch. Pozornosť je venovaná metódam použitých pre identifikáciu a charakterizáciu genómového zloženia *Festulolium*. Ďalej v práci nasleduje popis laboratórnej práce. Navrhla som 60 párov primerov z dostupných sekvencií DArT markerov a ich druhovú špecifickosť som overila v rámci 36 odrôd *Festuca* a *Lolium* pomocou metódy PCR. Našla som dva primery špecifické pre rod *Lolium*, ktoré by mohli byť použité na identifikáciu prvej generácie krížencov *Festulolium*. Produkty u 6 vybraných párov primerov boli osekvenované u dvoch diploidných odrôd za účelom identifikácie SNP markerov pomocou HRM metódy.

Summary

Grasses from Poaceae family are widely used as high quality feed for livestock and are also used for lawns and ornamental and play an essential role in protecting of environment. The most common genera include fescues and ryegrasses due to their agricultural features. Moreover, high yield and nutrition characteristics of ryegrasses and tolerance to biotic and abiotic stresses of fescues can be combined by intergeneric hybridization. Number of Festulolium (*Festuca* x *Lolium*) cultivars has been developed in several breeding stations and are of increasing popularity among farmers. However, their genomic constitution is highly variable within and among cultivars. This study aims to identify markers for quick and easy identification of interspecific grass hybrids, so that they are employable in breeding stations.

The first part of this thesis describes the most agriculturally important members of fescues and ryegrasses and their hybrids. Attention is paid to the methods used for identification and characterization of genomic composition of Festulolium. It is followed by the description of practical lab work. I designed 60 primer pairs from available sequences of DArT markers and verify their species-specificity within 85 cultivars of *Festuca* and *Lolium* by the PCR method. I found two markers which are *Lolium*-specific and can be lately used for identification of *Lolium* genome in first generations of Festulolium hybrids. Moreover, products from 6 primer pairs were sequenced in two diploid varieties to identify SNP markers by HRM method.

Obsah

1 Úvod	8
2 Ciele práce	9
3 Literárny prehľad	10
3.1 Čeľaď lipnicovité (<i>Poaceae</i>)	10
3.1.1 Rod <i>Lolium</i>	11
3.1.2 Rod <i>Festuca</i>	13
3.1.3 <i>Festulolium</i>	16
3.2 Metódy vhodné pre identifikáciu krížencov tráv	18
3.2.1 Morfológické znaky	18
3.2.2 Cytogenetické metódy	18
3.2.3 Prietoková cytometria	19
3.3 Molekulárne markery	20
3.3.1 Izoenzýmy	20
3.3.2 Jednoduché opakujúce sa sekvencie (SSR)	20
3.3.3 Vnútorne transkribované medzerníky (ITS)	21
3.3.4 Dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov (RFLP), polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP) a polymorfizmus náhodne amplifikovanej DNA (RAPD)	22
3.3.5 Jednonukleotidový polymorfizmus (SNP)	24
3.3.5.1 Analýza krivky teploty tavenia (HRM)	26
3.3.6 Diversity Array Technology (DArT)	28
4 Materiál a metódy	30
4.1 Rastlinný materiál	30
4.2 Výber DArT markerov a navrhnutie primerov	31
4.3 Izolácia DNA	31
4.4 PCR amplifikácia	32
4.5 Sekvenovanie	33
4.6 Analýza teplotných kriviek (HRM)	35
4.7 Zoznam použitých chemikálií	36
4.8 Použité pufry a komerčné kity	36
4.9 Vybavenie laboratória	37

5 Výsledky	38
5.1 Hľadanie markerov detekovateľných PCR reakciou	38
5.2 Hľadanie SNP markerov.....	45
6 Diskusia	50
7 Záver	53
8 Použité skratky	54
9 Zoznam použitej literatúry	56

1 Úvod

Trávy sú dôležité a široko kultivované plodiny. Taxonomicky sú zaradené do čeľade lipnicovitých. Patria medzi jednoklíčnolistové rastliny. Poľnohospodársky najviac využívané sú rody kostrava a mätonoh lebo poskytujú vysokokvalitné krmivo pre hospodárske zvieratá a sú vhodné na výsadbu trávnikov. Ich hospodársky významné vlastnosti, tolerancia voči stresu kostravy a výnosnosť mätonohu, kombinuje ich medzidruhový kríženec *Festulolium*.

Keďže genómová konštitúcia *Festulolium* je veľmi premenlivá i v rámci samostatných odrôd, je neustála potreba rýchlych a jednoduchých metód na identifikáciu medzidruhových krížencov. Pre druhy rodu *Festuca* a *Lolium* existuje veľa markerov, ktoré sa dajú detegovať najrôznejšími metódami. Tieto metódy dosť často narážajú na určité obmedzenia, či už finančnú alebo časovú náročnosť, špeciálne vybavenie alebo špeciálne vyškolených pracovníkov. Preto sa táto práca snaží vyvinúť markery, ktoré by bolo možné identifikovať nenáročnou a dnes už bežnou laboratórnou metódou PCR reakcie, a tým sa umožnila identifikácia medzidruhových krížencov tráv pre šľachtiteľské stanice.

2. Ciele práce

- Vypracovanie literárnej rešerše na tému magisterskej práce s použitím dostupných literárnych zdrojov.
- Z DArT sekvencií navrhnuť primery pre ododenie druhovo špecifických markerov.
- Overiť špecifitu navrhnutých primerov pomocou PCR reakcie.
- Navrhnuť jednoduchú a spoľahlivú metódu pre identifikáciu medzidruhových krížencov kostravy a mätonohu.

3 Literárny prehľad

3.1 Čeľad' lipnicovité (*Poaceae*)

Trávy z čeľade lipnicovitých *Poaceae* predstavujú veľmi pestrú a obsiahlu skupinu, ktorá je na území Českej republiky zastúpená 64 rodmi a viac ako 200 druhmi. Výskyt tráv je viazaný na trávne ekosystémy, z ktorých najvýznamnejšie sú spoločenstvá rôznych typov prirodzených a polo prirodzených lúčnych porastov. V systéme rastlín sú trávy zaradené medzi jednoklíčnolistové rastliny, charakterizované prítomnosťou jedného klíčneho lístku, nepravou koreňovou sústavou (podzemok, hl'úza) a rovnobežnou žilnatinou listov. Kvetný obal je nerozlíšený a kvety sú trojpočetné. Patria sem druhy jednoročné, viacročné aj trvalky, oziminy a jariny, samoopelivé aj cudzoopelivé. Morfológicky tvoria pomerne jednotnú skupinu (Cagaš et al., 2010). Rod *Lolium* obsahuje osem druhov a rod *Festuca* zahŕňa približne 500 druhov, ktoré boli rozdelené do deviatich sekcií a to *Hesperochloa*, *Xanthochloa*, *Drymanthele*, *Schedonorus*, *Subulatae*, *Subuliflorae*, *Obtusae*, *Festuca* a *Helleria* (Clayton et Renvoize, 1986). Druhy *Festuca* a *Lolium* sú blízki príbuzní s obilninami. Tieto druhy majú mnoho genetických a biologických prvkov jedinečných pre tieto skupiny, napríklad vyššia trvácnosť kŕmnych tráv v porovnaní s obilninami z mierneho pásma (Alm et al., 2003).

Najviac využívané sú rody *Festuca* a *Lolium*, ktoré poskytujú kvalitné krmivo pre hospodárske zvieratá, takisto sa používajú aj pre výsadbu trávnikov, okrasné účely a hrajú zásadnú úlohu v ochrane životného prostredia. Druhy z uvedených dvoch rodov majú doplňujúce agronomické vlastnosti a často sú pestované v zmesiach. Pestovateľské úsilie kombinovať požadované vlastnosti v jednotlivých subjektoch vyvrcholia s výrobou krížencov nazvaných *Festulolium* a tieto odrody majú značný komerčný úspech a sú registrované po celom svete (Kopecký et al., 2006).

Trávy pokrývajú až dvakrát väčšiu plochu ako je celková rozloha ornej pôdy na Zemi (Jauhar, 1993). V Európe je až 23 % trávnatých plôch porastených práve dvoma druhmi tráv a to mätonohom mnohokvetým a mätonohom trvácim, čo sú najčastejšie sa vyskytujúce trávy. Počas jedného roka sa celkovo vyprodukuje až 45000 ton semien týchto tráv v hodnote asi 160 miliónov eur (Lubberstedt et al., 2003).

3.1.1 Rod *Lolium*

Rod *Lolium* zahŕňa agronomicky veľmi významné druhy a to konkrétne mätonoh trváci (*Lolium perenne* L.), čo je jeden z najkvalitnejších viacročných kŕmnych druhov tráv a súčasne základný druh pre trávniky a mätonoh mnohokvetý (*Lolium multiflorum* Lam.), ktorý sa používa na intenzívne pestovanie krmovín na ornej pôde. Oba tieto druhy sa prirodzene krížia a vzniká medzidruhový kríženec mätonoh hybridný (*Lolium hybridum* Hausskn.). U všetkých uvedených druhov boli vyšľachtené aj odrody s diploidným a tetraploidným počtom chromozómov. Tieto rastliny sa vyskytujú v strednej a južnej Európe a severozápadnej Ázii, sú rozšírené najmä v oblasti mierneho pásma, ale nachádzajú sa aj v Austrálii a Novom Zélande. (Cagaš et al., 2010). Z jednoročných druhov sú najznámejšie mätonoh mámivý (*Lolium temulentum* L.), v minulosti považovaný za burinu v jarných obilninách a mätonoh oddialený (*Lolium remotum* Schrank.), často sa vyskytujúci v ľane. Tieto dva druhy sa momentálne považujú za nezvestné na území Českej republiky, lebo v súčasnosti nie je známy žiadny živý zástupca vyskytujúci sa na poslednej známej lokalite a preto sa tieto taxóny zaradili do kategórie A2 a sú zapísané v Červenom zozname kveteny ČR (Cagaš et al., 2010).

Mätonoh mnohokvetý je prevažne dvojročný druh. Pochádza zo Stredomoria kde zasahuje až do južných alpských údolí. Tvorí voľné trsy, je stredného až vyššieho vzrastu (30 – 100 cm), bohato olistený, svetlo zelenej farby (obr. 1). Steblo je mohutné a priame alebo má 2 – 5 kolienok a na báze je červenkasté. Listové čepele sú ploché, 10 – 25 cm dlhé, na líci ryhované a na rube lesklé. Kvetenstvo predstavuje štíhly riedky dvojradý nepárny klas 15 – 30 cm dlhý (u tetraploidov môže byť aj dlhší). Plodom je obilka (Cagaš et al., 2010). Najvyšší výnos poskytuje v prvom úžitkovom roku. V prvom roku má zo všetkých tráv najvyššiu schopnosť konkurencie. Je to veľmi náročná tráva na ekologické činitele. Je rozšírený hlavne v teplejších oblastiach, pretože neznáša nižšie teploty. Takisto má aj vyššie nároky na obsah živín v pôde než iné kultúrne trávy. Nevyhovuje mu silne kyslá a mokrá pôda. Zo všetkých kŕmnych tráv poskytuje najväčší výnos osiva (Regal et Šindelářová, 1970). Je to diploidná rastlina a má $2n = 2x = 14$ chromozómov (Schifino et Winge, 1985). Veľkosť genómu 1Cx je 2567 Mb (Kopecký et al., 2010).



Obr. 1 *Lolium multiflorum*

Mätonoh trváci je viacročný, v priaznivých podmienkach až trvalý druh. Často sa vyskytuje na pastvinách, cestách a rumoviskách od nížin až po podhorie. Je najstaršou kŕmnu trávou, pestovanou v kultúre v Británii už od konca 17. storočia, odkiaľ sa rozšíril do ostatných krajín. Rastie vo voľných trsoch nižšieho vzrastu (10 – 60 cm), má sýtozelenú farbu a intenzívne odnožuje (obr.2). Stéblo je tenké a má 2 – 4 kolienka, na spodnej časti sa nachádza viac kolienok. Listy sú 5 – 20 cm dlhé, hladké, na líci výrazne hladké, na rube silne lesklé. Kvetenstvo je tvorené štíhlym, plochým, dvojradým nepárnym klasom dlhým 3 – 20 cm a plodom je obilka (Cagaš et al., 2010). Už v prvom úžitkovom roku dáva plný výnos. Priaznivo reaguje na zavlažovanie a pri nedostatku zrážok sa jeho výnos znižuje (Regal et Šindelářová, 1970). Počet chromozómov je $2n = 2x = 14$ (Carnahat et Hill, 1961). Veľkosť genómu 1Cx je 2623 Mb (Kopecký et al., 2010).



Obr.2 *Lolium perenne*

3.1.2 Rod *Festuca*

Rod *Festuca* je taxonomicky komplikovaný rod zastúpený na území Českej republiky 22 trvácnymi druhmi. Kostravy môžeme ešte rozdeliť do dvoch skupín podľa výšky a morfológie listov na

- a) druhy vyššieho vzrastu s plochými listovými čepeľami
- b) druhy nižšieho vzrastu s úzkymi až štetinovitými listami.

Pre neskoršie šľachtenie boli použité 4 druhy a to kostrava lúčna (*F. pratensis* Huds.) pre kŕmne účely, kostrava trst'ovitá (*F. arundinacea* Schreb.) a kostrava červená (*F. rubra* agg.) na kŕmne a trávnikové účely a kostrava ovčia (*F. ovina* agg.), ktorej odrody sú určené tak isto na trávnikové účely (Cagaš et al., 2010).

Kostrava lúčna je typický predstaviteľ mezofilných až hygrofilných lúk a pastvín na výživných a ťažkých pôdach. Vyskytuje sa na celom území ČR od nížin až po podhorie. Je to voľne trsnatá tráva stredného až vyššieho vzhľadu (40 – 100 cm), sýto zelenej farby (Cagaš et al., 2010). Je to krmná tráva, ktorá predstavuje významnú časť druhovo bohatých trvalých pasienkov a polí v alpskom a východnom regióne Európy. V Škandinávii je tiež hlavnou súčasťou intenzívnych porastov a siláže (Rognli et al., 2010). Častejšie rastie v nížinách, ale okrem extrémnych piesočnatých pôd rastie aj v rašeliniskách (Regal et Šindelářová, 1970). Kostrava lúčna je viacročná až trvalá rastlina (obr. 3). Poskytuje vysoké výnosy veľmi kvalitného krmiva. Je mrazuvzdorná, ale má slabšiu konkurenčnú schopnosť voči spôsobu obhospodarovania kvôli častému koseniu alebo silnému spásaniu (Cagaš et al., 2010). Plne vyvinutá je v druhom úžitkovom roku. V trávnatých zmesiach sa udržuje 7 – 10 rokov, avšak jednotlivé trsy postupne odumierajú. Veľmi cennou vlastnosťou kostravy lúčnej je jej výborná prispôsobivosť rôznym ekologickým podmienkam. Preto je zastúpená v 38% všetkých našich prirodzených porastov (Regal et Šindelářová, 1970). Rastlina je diploidná a počet chromozómov je $2n = 2x = 14$ (Nilsson, 1940). Veľkosť genómu 1Cx je 3175 Mb (Kopecký et al., 2010).



Obr. 3 *Festuca pratensis*

Kostrava trst'ovitá je viacročná rastlina, ktorá vytvára krátke podzemné výbežky, z ktorých môžu vzniknúť mohutné trsy, je robustnejšieho vzrastu ako kostrava lúčna a má drsnejšie listy až 10 mm široké. Silné plodné stebľá majú vystúpené kolienka a v priaznivých podmienkach dosahuje až 150 cm (obr.4) (Regal et Šindelářová, 1970). Výnosné schopnosti dosahuje až v druhom úžitkovom roku. Vysokú produkčnú schopnosť si udržiava veľa rokov. V prirodzených trávnatých porastoch nie je kostrava trst'ovitá príliš rozšírená. Často rastie na kukuričných a repkových poliach a ojedinele sa vyskytuje vo vysokohorskom prostredí. Je to podmienené nárokmi na živiny, o čom svedčí neprítomnosť v trávnatých spoločenstvách, ktoré dávajú prednosť pôdam s nižším obsahom živín. Nevyhovujú jej kyslé pôdy, ale dobre znáša vysokú koncentráciu pôdneho roztoku. Ľahko sa prispôsobuje rôznym stupňom pôdnej vlhkosti, ale nerastie na extrémne suchých alebo mokrych pôdach. Táto tráva patrí do sortimentu bežne pestovaných tráv. Kladom je vysoká výnosnosť, ale jej využitie na kŕmne účely sa znižujú drsnosťou a tvrdosťou krmoviny, ktorá znižuje chutnosť a stráviteľnosť u zvierat (Regal et Šindelářová, 1970). Rastlina je hexaploidná a má $2n = 6x = 42$ chromozómov (Nilsson, 1940). Veľkosť genómu 1Cx je 2845 Mb (Kopecký et al., 2010).



Obr. 4 *Festuca arundinacea*

3.1.3 Festulolium

Festulolium je prirodzený alebo syntetický medzidruhový kríženec, ktorý vzniká medzi obligátne cudzoopelivými druhmi rodov *Festuca* a *Lolium*. Šľachtiteľským cieľom medzidruhovej hybridizácie je kumulácia pozitívnych, hospodársky významných vlastností rodičov v novovytvorenom genóme. Sú to voľne trsnaté trávy tvoriace stredne husté, vzpriamené až polo vzpriamené, bohato olistené trsy sýto zelenej farby, vysoké 70 – 140 cm podľa typu kríženca a odrody (Cagaš et al., 2010).

Prvé odrody krížencov Festulolium boli vyvinuté v inštitúte pre výskum životného prostredia (IGER) v Aberystwyth vo Walse pred viac ako 40timi rokmi krížením odrody Prior z *L. perenne* a *F. pratensis* a odrody Elmet z *L. multiflorum* a *F. pratensis* (Lewis et al., 1973).

Odrody Festulolium je možné získať dvoma spôsobmi:

- a) introgresiou – vnesenie génov jedného druhu do genómu iného druhu medzidruhovým krížením a následným spätným krížením, v genóme jedného rodiča je iba veľmi malá časť druhého rodiča,
- b) amfiploidiou – inkorporácia génov jedného druhu do genómu druhého druhu, kde je zastúpenie genómu oboch rodičov približne rovnaké ako v genóme jedného rodiča

Kríženci môžu získať aj nové vlastnosti, ale nie je to bežné. Napríklad odroda Lofa je z hľadiska morfológických vlastností takmer identická s mätonohom trvácim, aj keď vznikla hybridizáciou odlišných druhov. Festucoidné krížence sú trvácnejšie, ozimného charakteru a lolioidné krížence sú krátkodobé. Rozlišujú sa dva typy krížencov, u ktorých ako materský druh je mätonoh mnohokvetý a otcovský kostrava lúčna alebo kostrava trst'ovitá. Odrody typu kostravy trst'ovitej vzniknuté krížením *L. multiflorum* ($2n = 14$) \times *F. arundinacea* ($2n = 42$) a spätným krížením s kostravou trst'ovitou vznikli hexaploidné odrody Felina, Fojtan, Hykor, Korina a Lesana a spätným krížením s tetraploidným mätonohom mnohokvetým vznikla odroda typu mätonohu mnohokvetého Bečva. Výberom jedincov z F2 a F3 generácie krížencov mätonohu mnohokvetého a kostravy trst'ovitej vznikla odroda Lofa, ktorá je podľa morfológických znakov veľmi podobná s mätonohom trvácim. Odrody vzniknuté

krížením *L. multiflorum* ($2n = 28$) \times *F. pratensis* ($2n = 28$) vznikli kríženci, ktorí boli medzi sebou podrobení samoopeleniu a vznikli odrody Perun, Perseus, Achilles a Hostyn (Cagaš et al., 2010, Ghesquière et al., 2010).

Felina a Hykor sú trváce odrody s vysokým výnosom a lepšou krmnou hodnotou ako kostrava trst'ovitá. Sú veľmi odolné voči extrémnym klimatickým podmienkam a to hlavne suchu, chladu, vysokej hladine spodnej vody, chorobám a krátkodobému zaplaveniu vodou. Predovšetkým sú určené do trvalých lúk. Fojtan má nižší výnos kvalitného krmiva, lepšie odoláva chorobám než ostatné odrody, hlavne hrdzi. Odrody Korina a Lesana dobre znášajú zaťažovanie a po poškodení rýchlo regenerujú. Nachádzajú sa v zmesi s lipnicou lúčnou a sú vhodné do polo intenzívnych a extenzívnych trávnikov dostihových dráh, konských pastvín a výbehov na letiskové plochy (Cagaš et al., 2010, Ghesquière et al., 2010).

Odroda Lofa má vysoký výnos krmoviny, má vysokú nutričnú hodnotu a pre zvieratá je veľmi chutná a dobre stráviteľná. Využíva sa hlavne na ornej pôde, na dočasných lúkach a pastvinách. Pestuje sa aj v čistých kultúrach, v zmesiach a s tetraploidnými odrodami d'ateliny lúčnej. Odroda typu mätonohu mnohokvetého Bečva je iba 1 – 2 ročná, je odolná voči plesni snežnej. Je určená na pestovanie v krátkodobých, d'atelinovo trávnatých zmesiach. V čistej kultúre sa používa na priamu konzumáciu a na konzervovanie silážovaním. Uvádza sa aj možnosť pestovania na svahovitých pozemkoch a v pásme ochrany vôd a ako protierózna ochrana pôdy. Odrody Achilles, Hostyn, Perseus a Perun sú trojročné odrody odolnejšie voči chladu, majú vysoký výnosový potenciál, kvalitné krmivo s vyšším obsahom cukrov a sú chutné a dobre stráviteľné. Je možné ich využiť na podobné účely ako odrodu Lofa (Cagaš et al., 2010, Ghesquière et al., 2010).

Vďaka vyššie uvedeným výhodným vlastnostiam sa postupne registrovalo viac než 30 odrôd *Festulolium* po celom svete, väčšina v strednej Európe (Fojtík, 1994, Zwierzykowski et al., 1998). Schopnosť produkovať medzirodových krížencov medzi rodmi *Festuca* a *Lolium* a komerčný úspech odrôd *Festulolium*, prispeli k výskumu ich štruktúry a genómového zloženia. Štúdia Kopecký et al., (2008) preukázala prispôsobivosť hybridných genómov a schopnosť homeologických chromozómov, pochádzajúcich z rôznych rodov ľahko sa párovať a rekombinovať.

3.2 Metódy vhodné pre identifikáciu krížencov tráv

3.2.1 Morfológické znaky

Bežne môžeme trávy identifikovať podľa vonkajších morfológických znakov ako tvar listov, výška, miesto výskytu, koreňová sústava, typ výhonkov a kvetenstvo. Náročnejšia až nemožná je identifikácia medzirodových a medzidruhových krížencov F1 a F2 generácie alebo jedincov pochádzajúcich z populácie spätných krížencov, kde navonok nemajú výrazné znaky. Preto je vhodnejšie na identifikáciu krížencov používať dostupné nástroje cytogenetiky a molekulárnej biológie.

3.2.2 Cytogenetické metódy

V súčasnej dobe sa v štúdiu genómov rastlín používajú molekulárne cytogenetické metódy, kde sa využívajú fluorescenčne značené sondy, ktoré umožnia vizualizovať špecifické sekvencie DNA na metafáznych chromozómoch naviazaných na mikroskopické sklíčko. Vizualizácia vzoriek prebieha pomocou fluorescenčného mikroskopu a CCD kamery (Schwarzacher, 2003). Fluorescenčná *in situ* hybridizácia je metóda, kde dochádza k hybridizácii cieľovej sekvencie DNA a fluorescenčne značenej sondy. Ako sondy sa využívajú špecifické sekvencie genómu. Je vhodná pre fylogenetické štúdium alopolyploidie. V publikácii Thomas et al. (1997) použili ako sondy rDNA. Podľa počtu a pozície 45S rDNA a 5S rDNA lokusov sa potvrdilo, že *F. pratensis* a *F. glaucescens* sú predkami *F. arundinacea*. Výhodami fluorescenčnej *in situ* hybridizácie sú časová nenáročnosť, rádovo vyššia senzitivita a účinnosť hybridizácie a detekcie. Určitou nevýhodou tejto metódy je jej finančná náročnosť a obmedzená detekcia počtu špecifických sekvencií.

Metóda genómovej *in situ* hybridizácie (GISH) využíva hybridizáciu cieľovej molekuly DNA s fluorescenčne značenou sondou z genomickej DNA. Prvýkrát bola metóda GISH použitá v štúdiu Schwarzacher et al. (1989) pre analýzu rodičovských chromozómov kríženca vzniknutého krížením *Secale africanum* Stapf. a *Hordeum chilense* Roem et Schult. Túto techniku je možné použiť pre charakteristiku genómov, konkrétnych chromozómov u krížencov a alopolyploidných jedincov a porovnanie genómov príbuzných druhov, čo využili pri analýze evolučných vzťahov u *Zea mays* (Poggio et al., 2005).

U krížencov *Festuca* × *Lolium* bola prvýkrát metóda genómovej *in situ* hybridizácie (GISH) použitá v práci Thomas et al. (1994). Táto metóda umožnila zefektívniť štúdium rekombinácií, analýzu párovania chromozómov u krížencov *Festulolium* (Kopecký et al., 2008) a určiť zloženie genómu odrôd *Festulolium* vzhľadom na rodičov (Kopecký et al., 2006).

Nevýhodou tejto metódy je, že poskytuje obmedzené rozlíšenie a nízku kapacitu, dôsledkom čoho je horšie využitie metódy pri procese kríženia a ďalšej tvorby nových odrôd (Kopecký et al., 2009).

3.2.3 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria je metóda využívaná na štúdium buniek alebo chromozómov v suspenzii na základe ich chemických a fyzikálnych vlastností. Tak isto slúži na zistenie stupňa ploidity a veľkosti genómu. Princípom je meranie a analýza optických vlastností častíc (buniek, jadier, chromozómov), jednotlivých prúdiacich v úzkom stĺpci nosnej kvapaliny. Hydrodynamickou fokusáciou sa zabezpečí prechod konkrétnej častice, k čomu dochádza vo vnútri prietokovej komôrky, v ktorej sa jednotlivé častice zoradia. Priemer otvoru, cez ktorý prúdia častice je 50 – 100 µm s rýchlosťou prúdenia 1 – 10m/s. Častice prechádzajú lúčom laseru 100 – 1000 častíc/s. Častice sú zafarbené špecifickým farbivom a následne ožiarené svetlom s vhodnou vlnovou dĺžkou, vďaka čomu dôjde k excitácii fluorochromu a v konečnom dôsledku k vyžiareniu svetelnej energie s inou vlnovou dĺžkou než spôsobila excitáciu. Tento svetelný signál je zachytený pomocou fotonásobičov a premenený na elektrické impulzy, ktoré sú následne spracované. Výstupom analýzy je histogram, zobrazujúci relatívnu intenzitu fluorescencie meraných častíc (Haynes, 1988). Vďaka rozdielnemu obsahu DNA u rodičovských rastlín, bola táto metóda úspešne použitá na zistenie medzirodových krížencov *Festulolium*, kde sa analyzovali kríženci, konkrétne F1 *L. multiflorum* × *F. arundinacea* var. *glaucescens* (L4F4) a *L. multiflorum* × *F. arundinacea* var. *genuina* (L4F6), a ich spätní kríženci (Kerlan et Ghesquière, 1997).

Táto metóda je časovo náročná a finančne nákladná na zabezpečenie prístroja a rovnako je potrebné zabezpečiť kvalifikovaného odborníka na prácu s týmto prístrojom.

3.3 Molekulárne markery vhodné pre identifikáciu krížencov tráv

V súčasnej dobe existuje niekoľko typov markerov, využívaných na identifikáciu druhov *Festuca*, *Lolium* a krížencov *Festulolium*. Medzi používané patria izoenzýmy, SSR, RFLP, AFLP, RAPD, ITS, SNP a DArT markery.

3.3.1 Izoenzýmy

Prvé z molekulárnych markerov použitých na štúdium vzťahov medzi druhmi *Festuca* a *Lolium* boli izoenzýmy. Izoenzýmy sú enzýmy, ktoré sa líšia v aminokyselinovej sekvencii a katalyzujú rovnakú reakciu. Tieto enzýmy môžu mať odlišné kinetické parametre aj regulačné vlastnosti. Sú kódované v iných genetických lokusoch, ktoré zvyčajne vznikajú génovou duplikáciou alebo divergenciou. Izoenzýmy môžeme odlišiť na základe elektroforetickej pohyblivosti (Berg et al., 2002) a môžeme ich použiť ako markery práve vďaka odlišnej štruktúre aminokyselín.

V štúdiu tráv boli izoenzýmy použité na zistenie vzťahu medzi druhmi rodu *Lolium*. Z tejto štúdie vyplýva, že *Lolium rigidum* je najrozmanitejší druh a mohol by byť spoločný predok rodu *Lolium* (Charmet et al., 1994). Tieto enzýmy boli použité aj pre identifikáciu medzirodových krížencov *Festuca* × *Lolium* (Eizenga et Buckner, 1986). Nevýhodou týchto markerov je hlavne ich malý počet a vznik monomorfných lokusov ich variabilitou.

3.3.2 Jednoduché opakujúce sa sekvencie (SSR)

Ďalším typom molekulárnych markerov sú jednoduché opakujúce sa sekvencie alebo mikrosatelity. Mikrosatelity sú krátke, tandemovo sa opakujúce jednoduché sekvenčné motívy o dĺžke 2 – 6 bp. Najfrekvencovanejšie typy mikrosatelitov sú tvorené dinukleotidovým motívom, ale vyskytujú sa aj tri- a tetranukleotidové motívy. Vyskytujú sa v kódujúcich aj nekódujúcich oblastiach a je pre ne charakteristická vysoká mutačná rýchlosť (Zima et al., 2004). Predovšetkým sú rozšírené v eukaryotických a prokaryotických genómoch (Field et Wills, 1998; Tóth et al., 2000).

Homozygotný lokus mikrosatelitu má rovnaký počet opakovaní na oboch homologických chromozómoch a heterozygotný lokus má iný počet opakovaní na každom alelu. Avšak v rovnakom lokuse v populácii sa zvyčajne nachádza niekoľko alieli z rozdielnym počtom repetícií, čo znamená, že mikrosatelity sú veľmi užitočné pre rozlíšenie jednotlivcov (Oliveira et al., 2006).

Mikrosatelity sú vhodné na fingerprinting kultivarov, konštrukciu väzbových máp, selekciu pomocou markerov (MAS), štúdium genetickej diverzity a na fylogenetické a evolučné štúdie (Egan et al., 2012). Použitím špecifických primerov boli SSR markery využité na identifikáciu odrôd *Festuca*, *Lolium* a *Festulolium* v práci Momotaz et al. (2004). Metodika je časovo nenáročná. Nemalou nevýhodou je prítomnosť nulových alieli, ktoré sa neamplifikujú a nevzniká tak produkt (Dakin et al., 2004). Samotná príprava primerov vyžaduje znalosť sekvencie DNA a je finančne nákladná.

3.3.3 Vnútorne transkribované medzerníky (ITS)

ITS sekvencie patria medzi najrozšírenejšie molekulárne markery pre odvodenie fylogenetických vzťahov u rastlín. Sekvencie obsahujú dva medzerníky ITS – 1 a ITS – 2, ktoré oddeľujú 18S, 5,8S a 26S gény. Oba medzerníky majú frekvenciu substitúcie nukleotidov dostatočne vysokú, aby vznikla vnútrodruhová a medzidruhová variabilita (Hillis et al., 1991, Baldwin et al., 1995).

Podľa zistených údajov o ITS v oblasti rDNA v jadrovom genóme je možné použiť ich pre štúdium fylogénie tráv, napríklad v práci Hsiao et al. (1995) bolo analyzovaných 25 druhov z podrodiny *Pooideae* a z tráv boli použité *F. arundinacea* a *F. mairei*. Hand et al. (2010) použila pre analýzu 18 druhov kostravy, 3 druhy mätonohu a hrebienku obyčajnú (*Cynosurus cristatus* L.). Kostravy *F. pratensis* a *F. arundinacea* var. *glaucescens* boli určené ako pravdepodobní predkovia dvoch morfortypov *F. arundinacea*. ITS sekvencie sa veľmi často nepoužívajú, najmä pre nízky počet dostupných markerov.

3.3.4 Dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov (RFLP), polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP) a polymorfizmus náhodne amplifikovanej DNA (RAPD)

Ďalším z molekulárnych markerov je polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov (RFLP), ktorý vzniká mutáciou nukleotidovej sekvencie v mieste štiepenia restričnou endonukleázou. Môžu vzniknúť nové rekogničné miesta alebo zaniknúť. Tieto mutácie spôsobujú variabilitu v dĺžke vzniknutých fragmentov. Fragменты získané enzymatickým štiepením sa elektroforeticky separujú na agarózovom géli a môžeme ich detegovať použitím etídium bromidu a vizualizovať UV svetlom alebo ich detegujeme pomocou Southernovej hybridizácie (Snustad et Simmons, 2009). RFLP markery boli použité na určenie genomického vzťahu rodičovských druhov *F. mairei* a *L. perenne* a ich medzirodových krížencov. Analýza u krížencov potvrdila, že kostrava *F. mairei* je príbuzná s *L. perenne* (Chen et al., 1995).

Veľkou nevýhodou použitia týchto markerov je potreba veľkého množstva kvalitnej DNA, pracnosť a časová náročnosť. Preto sa prevádzajú na markery PCR – RFLP lebo pre analýzu stačí použiť menšie množstvo DNA a zmeny v sekvencii sa dajú rýchlejšie zaznamenať (Gibson et Muse, 2009).

Do tejto skupiny markerov ďalej patrí metóda AFLP, pri ktorej sa študovaná vzorka DNA naštiepi restričnou endonukleázou, naamplifikuje v PCR reakcii a analyzuje na géli. Markery využívajúce polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP) môžeme použiť na saturačné mapovanie, mapovanie QTL a rozlíšenie odrôd (Gibson et Muse, 2009). U tráv boli AFLP markery použité na zistenie prenosu segmentov Fp chromozómov medzi triploidnými krížencami vytvorenými z 4x *L. perenne* a 2x *F. pratensis* spätne kríženými s *L. perenne*. Pomocou AFLP markerov sa zistilo, ktorá väzbová skupina je individuálne zastúpená u BC1 krížencov. Tri väzbové skupiny mali úplne substituované Fp chromozómy a dve väzbové skupiny mali substituované jedno rameno Fp chromozómu (King et al., 1998). Nevýhodou je dominantný charakter markerov a zložitá optimalizácia metódy (Gibson et Muse, 2009).

Poslednými markerami v tejto skupine sú náhodne amplifikované polymorfne DNA (RAPD). RAPD markery môžu byť použité na rýchle odlišenie druhov a štúdium fylogenetických vzťahov, lebo nie sú výrazne ovplyvnené podmienkami prostredia. Sú lacné, nevyžadujú informácie o genóme a sú vhodné na skúmanie genetickej variability v mnohých rastlinách. Použité primery sú tvorené krátkymi sekvenciami, majú 9 – 10 rôznych nukleotidov, ktoré netvorí palindróm. Nasadajú na obe vlákna DNA a vzniká mnoho produktov o rôznej dĺžke. Polymorfizmus je buď prítomný alebo neprítomný (Williams et al., 1990).

RAPD markery boli použité na štúdium genetickej diverzity u druhov rodu *Lolium* práve vďaka jednoduchosti prevedenia, nízkym nákladom a nevyžadujú znalosti sekvencie DNA (Stammers et al., 1995; Vieira et al., 2004; Bolaric et al., 2005). V štúdiu Ma et al. (2013) bolo použitých 50 náhodne vybraných RAPD primerov, z ktorých 13 bolo vybraných na analýzu. Celkovo bolo nájdených 367 RAPD fragmentov, z ktorých bolo 95,9 % polymorfných naprieč druhmi rodu *Lolium*. Podľa analýzy bolo 8 druhov rozdelených do dvoch klastrov – samoopelivé (*L. persicum*, *L. temulentum*, *L. remotum*, *L. subulatum*) a cudzoopelivé (*L. multiflorum*, *L. perenne*, *L. rigidum*, *L. canariense*), čo naznačovali už predchádzajúce štúdie pomocou izoenzýmov (Charmet and Balfourier, 1994), ITS sekvencií (Charmet et al., 1997; Gaut et al., 2000), RFLP (Charmet et al., 1997), RAPD (Stammers et al., 1995) a morfológických údajov (Mirjalili et al., 2008).

Aj napriek kladam týchto markerov je ich veľkou nevýhodou dominantný charakter ako u AFLP, lebo práve vďaka tomu nie je možné určiť, či amplifikovaný úsek pochádza z homozygotného alebo heterozygotného lokusu. Tieto markery majú nízku reprodukovateľnosť PCR a v súčasnosti sa veľmi nepoužívajú. Nevýhodou je tiež malá dĺžka primerov, vďaka čomu môžu nasadnúť na rôzne miesta DNA sekvencie a v rôznych smeroch amplifikovať fragmenty DNA.

3.3.5 Jednonukleotidový polymorfizmus (SNP)

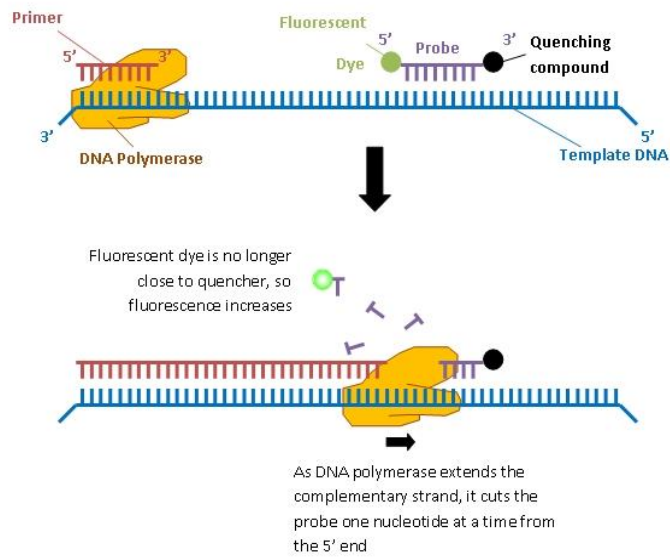
SNPs sú prirodzene sa vyskytujúce jednonukleotidové varianty v genóme, vznikajúce mutáciou. Ku zmene nukleotidu na iný môže dôjsť tranzíciou alebo transverziou. V súčasnosti sú SNP markery veľmi často používané v pozičnom klonovaní, evolučných štúdiách, pre charakteristiku a zloženie populácie (Gibson et Muse, 2009). Ich výhodou je, že sa v genóme vyskytujú vo veľkom počte, menej podliehajú mutáciám ako mikrosatelity a predovšetkým sú v genóme rovnomerne rozptýlené.

Na identifikáciu SNP markerov sa dá použiť niekoľko metód, napríklad metóda jednoreťazcového konformačného polymorfizmu (SSCP). Používa sa zdenaturovaná DNA, ktorá sa nanesie na nedenaturačný polyakrylamidový gél. Elektroforéza prebieha pri 4°C, kedy DNA nerenaturuje a jednovláknové sekvencie vytvoria intramolekulárne sekundárne štruktúry, na základe čoho môžeme rozlíšiť heterozygota od homozygota. Alelovo špecifická oligohybridizácia (ASO) je metóda, pri ktorej sa rozdelia získané PCR produkty na agarózovom géli, zdenaturujú sa a prenesú na membránu, na ktorej sa hybridizujú s krátkymi oligonukleotidmi (15 bp). Signál vzniká iba pri 100% komplementarite (Gibson et Muse, 2009).

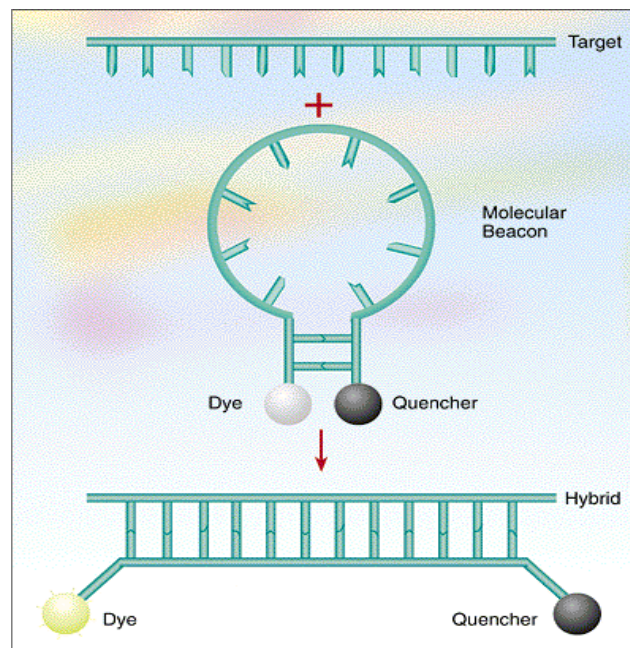
Ďalšou metódou na detekciu SNPs je metóda pod názvom Ecotilling. Použijeme DNA z populácie, ktorá obsahuje mutáciu a z populácie bez mutácie. Pomocou PCR reakcie sa úseky DNA naamplifikujú, vzorky DNA sa zmiešajú a zdenaturujú. Pri nasledujúcej renaturácii sa vytvoria homoduplexy a heteroduplexy. V sekvencii heteroduplexu je miesto nezhody rozštiepené CEL 1 endonukleázou, čo môžeme na géli alebo sekvenátore rozlíšiť prítomnosťou dvoch fragmentov. Homoduplex vytvorí iba jeden fragment (Comal et al., 2004).

Analýza pomocou fluorescenčne značených prób TaqMan a Molecular Beacon je ďalšou možnou metódou a v súčasnosti je často využívaná. Princíp je v prítomnosti dvoch fluorescenčných farieb s prekrývajúcimi sa spektrami označené ako reportér a zhášač. Pokiaľ sú v tesnej blízkosti tak k fluorescencii nedochádza. TaqMan próba sa naviaže na komplementárny reťazec DNA a pri predlžovaní nového reťazca sa sonda odbúra a dochádza k fluorescencii, lebo reportér a zhášač sa oddialia. Próby Molecular Beacon sú vytvorené zo sľučky a po naviazaní na komplementárny reťazec dochádza

k fluorescencii práve oddialením reportéra a zhášača (www.lifetechologies.com, Nollau et Wagener, 1997).



Obr. 5 Princíp analýzy próbou TaqMan



Obr.6 Princíp analýzy próbou Molecular Beacon

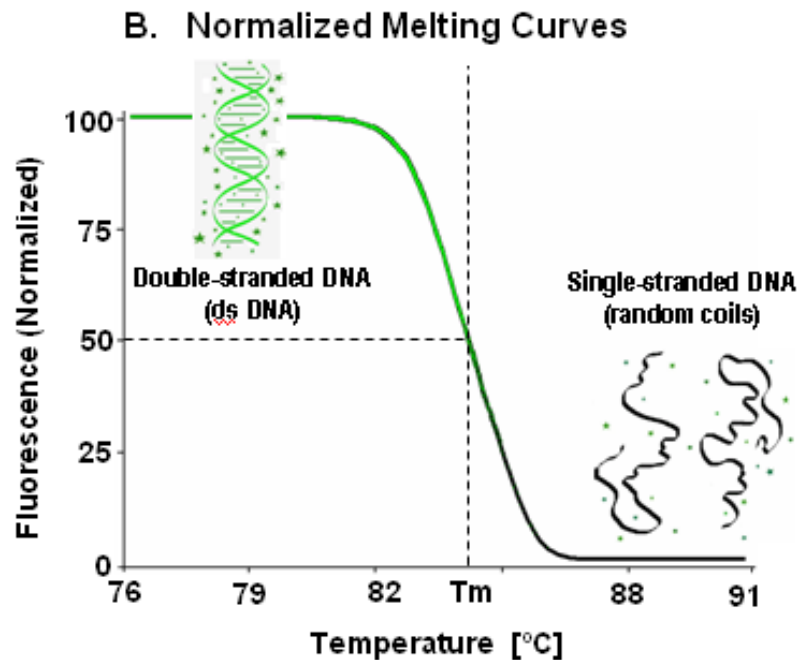
Rovnako u tráv často používanou metódou je metóda predĺženia o jednu bázu (SBE). Patrí medzi minisekvenačné metódy a je schopná analyzovať jednonukleotidové polymorfizmy. Dochádza k predĺženiu 3' konca naviazaného primeru o jediný dideoxynukleozidtrifosfát (ddNTP), ktorý je fluorescenčne značený. Primer sa viaže 1 bázu pred SNP miesto svojím 3' koncom. Reakcia môže prebiehať na čipe aj v roztoku. V jednej reakčnej zmesi možno identifikovať viacero SNPs navrhnutím rôzne dlhých primerov. Produkt je možné separovať kapilárnou elektroforézou a ďalej analyzovať pomocou dostupných programov, napríklad GeneMaker® (Bernat et al., 2002). Táto metóda bola použitá na identifikáciu nepříbuzných rastlín *Trifolium occidentale* D.E. Coombe a *Trifolium pallescens* Schreb. ako možných predkov druhu ďateliny *Trifolium repens* L. Na základe priradených haplotypov bola pozorovaná blízka podobnosť medzi genómom *T. occidentale* a jedným subgenómom *T. repens*, ale príbuznosť medzi *T. pallescens* a ďalším subgenómom *T. repens* bola nižšia (Hand et al., 2008). Preto sa táto metóda ukázala ako vhodná na identifikáciu SNPs u aloploidných druhov, ktorých pôvod nie je známi.

V neposlednom rade existuje metóda analýzy teplotných kriviek (HRM), ktorá bola použitá v tejto práci a z toho dôvodu je uvedená v nasledujúcej kapitole.

3.3.5.1 Analýza krivky teploty tavenia (HRM)

HRM je jednoduchá metóda založená na princípe PCR reakcie, ktorá rozpoznáva zmeny v DNA sekvencii meraním zmeny teploty tavenia dvojvláknovej DNA (dsDNA) (Ririe et al., 1997). U tejto techniky sa používajú fluorescenčné interkalačné farbivá, ktoré merajú kvantitu dsDNA počas PCR reakcie a umožňujú detegovať vznikajúce heteroduplexy po PCR reakcii, čo je možné pozorovať zmenou krivky a teploty tavenia. Dochádza k taveniu dvojšróbovice DNA na jednovláknovú a postupnému znižovaniu hodnoty fluorescencie postupným uvoľňovaním farbiva (obr.7) (Wilhelm et Pingoud, 2003). Fluorescenčné farby používané v tejto metóde sú napríklad LCGreen® (Idaho Technology Inc.), Syto9® (Invitrogen, Carlsbad, CA) a EvaGreen® (Biotum), ktoré majú mierne odlišné vlastnosti a vyžadujú si použitie odlišných PCR pufrov a podmienok a výrazne sa líšia v cene (Vossen et al., 2009). Výhodou týchto farbív je, že neinhibujú

PCR reakciu, nie sú toxické a dochádza k minimálnej redistribúcii počas tavenia DNA (Erali et al., 2008).



Obr. 7 Priebeh HRM reakcie

Táto metóda je vhodná na analýzu polymorfizmu u mikrosatelitov a SNPs u rastlín (Mader et al., 2008). Bola použitá napríklad na charakteristiku SNPs u hexaploida ovsu (Oliver et al., 2011), na zamapovanie SNPs pre pokrytie génu rezistencie na sneť u jačmeňa (Lehmensiek et al., 2008) a na mapovanie polymorfizmu pomocou SSRs a SNPs markerov F2 populácie *L. perenne* (Studer et al., 2009). U človeka sa používa na analýzu metylácie DNA, ktorá spôsobuje zmeny v expresii génov (Ehrich et al., 2006) a analýzu ľudskej mitochondriálnej DNA (Dobrowolski et al., 2009).

Prístroje pre túto metódu sú stále dokonalejšie, čím sa výrazne zvyšuje citlivosť a reprodukovateľnosť a znižujú sa prevádzkové náklady. Nevýhodou tejto metódy je však používanie veľmi nízkych koncentrácií a objemov DNA a primerov, vďaka čomu môže dôjsť k chybám pri príprave vzoriek na analýzu a aj chybnému hodnoteniu výsledkov.

3.3.6 Diversity Arrays Technology (DArT)

Poslednou zo spomínaných metód je Diversity Arrays Technology (DArT), vďaka ktorej je možné určiť vnútrodruhovou a medzidruhovou variabilitu. Táto metóda sa stala cenným zdrojom markerov, ktorými môžeme genotypovať genómy, ktorých sekvencie nepoznáme (Jaccoud et al, 2001). Je založená na redukcii genomovej komplexity. Na vytvorenie genómových reprezentácií sa použijú dve restriktívne endonukleázy – často štiepiaca, napríklad *Bst*NI a vzácné štiepiaca *Pst*I. Ku vytvoreným miestach vzniknutých pôsobením *Pst*I, sa nalignujú adaptéry a dochádza k amplifikácii z primerov komplementárnych k *Pst*I adaptérom. Vzniknú dva typy fragmentov, konštantné u všetkých jedincov daného druhu a polymorfne, ktoré sa nachádzajú iba u niektorých jedincov. Ďalej sa získané fragmenty zaklonujú do vektoru, ktorý je vnesený do *E. coli*, a vytvorí sa knižnica. Jednotlivé klony z knižnice sa naniesú na mikroskopické sklíčko a vytvorí sa microarray. Takto pripravenú microarray je možné použiť na analýzu genotypu hybridizáciou s fluorescenčne označenou študovanou DNA.

DArT markery sú často používané v štúdiách rozmanitosti a na konštrukciu a saturáciu genetických máp (Wenzl et al., 2006). Tieto markery boli využité aj na analýzu dôležitých poľnohospodárskych vlastností hexaploida pšenice, napr. rezistenciu voči popáleninám (Singh et al., 2010). Tieto markery môžu byť sekvenované a fyzicky mapované v kompletne osekvenovaných genómoch modelových druhov a použité pre ďalšie pochopenie umelých vzťahov medzi chromozómami kŕmnych tráv. To môže následne viesť k účinnejšej identifikácii génov, ktoré sú základom dôležitých poľnohospodárskych vlastností (Kopecký et al., 2009).

DArTFest array bola vytvorená práve pre jednoduchšie skúmanie komplexu *Festuca – Lolium*. V práci Kopecký et al. (2009) bolo analyzovaných 167 odrôd troch druhov kostravy (*F. arundinacea*, *F. glaucescens* a *F. pratensis*) a dvoch druhov mätonohu (*L. multiflorum* a *L. perenne*). Microarray obsahuje 7680 sond odvodených z metylfiltrovanej genómovej reprezentácie vyššie uvedených druhov. Bolo identifikovaných 3884 polymorfných markerov, ktoré boli ďalej použité na genotypovanie 5 krížencov *Festulolium*. Vyvinutím metódy DArTFest array sa získalo veľké množstvo polymorfných markerov a rozhodli sme sa ich v tejto práci použiť pre hľadanie nových markerov pomocou metódy PCR.

V nasledujúcich kapitolách sú uvedené metódy, ktoré som vo svojej diplomovej práci použila pre nájdenie druhovo špecifických markerov. Hľadať SNP markery sme sa rozhodli preto, lebo ich výhodou je nenáročná metodika a rýchlosť použitia, veľký počet v genóme, výraznejšie nie sú ovplyvnené mutáciami a preto by bolo možné ich využiť v tejto práci, lebo identifikáciou druhovo špecifických SNPs sa naše laboratórium intenzívne zaoberá.

Na detekciu SNPs som použila sekvenovanie PCR produktu s mnou navrhnutými primerami a metódu analýzy kriviek teploty tavenia DNA (HRM). Na nájdenie druhovo špecifických markerov by sa dalo použiť veľa iných vyššie uvedených metód, ale ja som použila nižšie uvedené metódy pre ich dostupnosť na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci. Táto práca je zameraná na prevod DArT markerov na PCR markery, ktoré budú spoľahlivé a striktne druhovo špecifické pre identifikáciu F1 krížencov a jednoduché na použitie šľachtiteľskými stanicami.

4 Materiál a metódy

4.1 Rastlinný materiál

Na analýzu som použila 85 odrôd troch druhov tráv, konkrétne 29 odrôd kostravy lúčnej, 27 odrôd mätonohu trváceho a 29 odrôd mätonohu mnohokvetého, viz tabuľka 1. Semená rastlín, ktoré som mala k dispozícii boli získané zo šľachtiteľskej stanice DLF Hladké Životice.

Tab.1 Zoznam testovaných odrôd kostravy a mätonohu.

Kostrava lúčna (<i>Festuca pratensis</i> Huds.)	Mätonoh trváci (<i>Lolium perenne</i> L.)	Mätonoh mnohokvetý (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.)
BARCRYPTO	ABERMAGIC	ABYS
COSIMA	CANCAN	ADIN
COSMOLIT	FOXTROT	ALTRIA
COSMONAUT	GREEN FAIR trávnikový	BELLUNA
DEDINOVSKAYA	INDIANA	CORDELLIA
FURE	OPTION	FOX
JAMAICA	PREMIUM	INDUCER
JUSTA	RECOLTA	IS-LMD 12
KOLUMBUS	REGAL trávnikový	ITAKA
KRASNOUFIMSKAYA 93	TELSTAR	KURI
LAURA	TWYSTAR	LIGRANDE
MAKIBASAKAE	ANAKONDA	MELCHIOR
MARUSAKAE	ASTON ENERGY	PODIUM
MINTO	AUBISQUE	RANGIFER
NORILD	CALIBRA	SULTAN
PARADISIA	DEXTER	TIGRIS
PETRARCA	ELGON	YOLANDE LMD PX2 107
PRADEL	KENTAUR	CABALLO
PRAXILA	MAGICIAN	GISEL
PREVAL	MATHILDE	IS-LMT 15
PRONELA	MISSOURI	JEANNE
RASKILA	MODANE	KIGEZI 1 CL 00-4122
REVANSH	NEPTUN	MONDORA
RICARDO	SIGNUM	SALOME
SENU	TETRA GREEN trávnikový	TAURUS
STELLA	TIVOLI	TONYL
TOMASAKAE	VIK 66	UNDINE (LMT 02-4141)
TYKO		VIRGYL
PARADUS		ZEBU

4.2 Výber DArT markerov a navrhnutie primerov

Na základe dostupných sekvencií DArT markerov publikovaných v článku Bartoš et al., (2011), som si vybrala 30 špecifických pre kostravu lúčnu a 30 špecifických pre mätonoh mnohokvetý a mätonoh trváci. V programe Primer 3 som navrhla 60 párov primerov, ktoré som ďalej používala.

4.3 Izolácia DNA

Z dostupných odrôd pomocou návodu kitu Invisorb® Spin Plant Mini Kit vyizolujeme celkovú DNA. Z konkrétnych rastlín odoberieme po 100 mg zdravých a mladých listov a dáme vysušiť na 24 hodín do lyofylizéra pri teplote 37 °C. Takto usušené rastliny zhomogenizujeme v oscilačnom mlyne.

K rozdrveným listom pridáme 400 µl lyzačného pufru P a 20 µl proteínázy K. Takto pripravené vzorky sa inkubujú 3 minúty vo vodnom kúpeli pri teplote 65 °C. Počas inkubácie je dobré vzorky občas premiešať. Po inkubácii vzorky premiestnime do kolóniek s označením prefilter a dáme centrifugovať na 1 minútu pri 12000 otáčkach za sekundu. Odstránime kolónky a k získanému filtrátu pridáme 200 µl väzbového pufru P a prenesieme do kolóniek s označením spin filter, inkubujú sa 1 minútu pri izbovej teplote a centrifugujú 1 minútu pri 12000 otáčkach za sekundu.

Filtrát odstránime a kolónky prečistíme pridaním 550 µl Wash pufru I a vzorky sa centrifugujú 1 minútu pri 12000 otáčkach za sekundu. Zase filtrát odstránime a pridáme 550 µl Wash pufru II, centrifugujeme 1 minútu pri 12000 otáčkach za sekundu. Tento krok sa zopakuje ešte raz. Kolónky znova s centrifugujeme 2 minúty pri 12000 otáčkach za sekundu pre dokonalé odstránenie premývacieho pufru.

V kolónkach zostala zachytená DNA, ktorú premiestnime do nových 1,5ml skúmaviek a pridáme 80 µl elučného pufru D predhriateho na 65 °C a inkubujeme 3 minúty. Potom vzorky centrifugujeme 1 minútu pri 10000 otáčkach za sekundu. Kolónky odstránime a v skúmavkách zostala zachytená DNA, ktorej kvalitu a koncentráciu zmeriame a nariedime podľa potreby. Vzorky DNA sa uchovávajú pri teplote – 20 °C.

4.4 PCR amplifikácia

Všetkých 60 párov primerov som otestovala na 85 genotypoch pomocou PCR reakcie a ich špecificitu som určila na 1,5% agarózovom géli. Podmienky PCR a zloženie premixu je v tabuľke 2 a 3. Jednotlivé chemikálie napipetujeme do skúmaviek podľa poradia v tabuľke 3.

Tab. 2 Podmienky PCR reakcie.

Denaturácia	95 °C	5 min	1x
Amplifikácia	95 °C	1 min	25x
	60 °C	2 min	
	72 °C	2 min	
Elongácia	72 °C	10 min	1x

Tab. 3 Množstvo chemikálií pipetovaných do premixu.

Chemikálie	Objem (μl)
Creasol red	2
10x PCR pufoer	1
10 mM dNTPs	0,2
Primer F+R	0,2
Taq pol. (4 U/μl)	0,2
DNA (10 ng/ml)	2
dH ₂ O	4,4

4.5 Sekvenovanie

Prečistenie PCR produktu – ExoSap reakcia

Samotnému sekvenovaniu predchádza niekoľko nižšie uvedených krokov dôležitých pre upravenie PCR produktov.

Na doštičku napipetujeme 3 μ l PCR produktu a pridáme 4 μ l premixu (tab. 4). Takto pripravené vzorky sa dajú inkubovať do cykléru za podmienok 37 °C/30 min a 95 °C/5 min.

Tab. 4 Zloženie premixu, objem na 1 vzorku.

Chemikálie	Objem (μ l)
1x PCR pufor	3,45
Alkalická fosfatáza FastAP	0,5
Exonukleáza I	0,05

Sekvenačná reakcia BigDye

Premix si pripravíme podľa rozpisu v tabuľke 5, rozpipetujeme do jednotlivých jamiek 96 jamkovej doštičky. Doštička sa inkubuje v cyklery podľa podmienok v tabuľke 6.

Tab. 5 Zloženie premixu, objem na 1 vzorku.

Chemikálie	Objem (μ l)
Prečistený PCR produkt	3
5x sekvenačný pufor	1,5
BigDye	1
Primer F/R	1
dH ₂ O	3,5

Tab. 6 Podmienky sekvenačnej reakcie.

98 °C	5 min	1x
96 °C	10 sec	60x
50 °C	5 sec	
60 °C	4 min	

Prečistenie PCR produktu po sekvenačnej reakcii

Pred použitím premiešame Agencourt CleanSEQ, aby došlo k úplnému resuspendovaniu magnetických guličiek. Do každej jamky pridáme 5 µl Agencourt CleanSEQ a 85% etanol podľa tabuľky 7. Pipetou premiešame roztok dokiaľ nie je homogénny.

Tab. 7 Množstvo 85% etanolu na objem sekvenačnej reakcie.

Objem sekvenačnej reakcie (µl)	Objem 85% etanolu (µl)
5	31
10	42
15	52
20	62
25	73

Doštičku premiestnime na Agencourt SPRIPlate magnet a necháme stáť 3 – 5 minút. Supernatant odpipetujeme a vzorky prečistíme pridaním 100 µl 85% etanolu, počkáme 30 sekúnd. Etanol odpipetujeme a znova pridáme 100 µl 85% etanolu. Po odpipetovaní etanolu vzorky necháme vysušiť pri izbovej teplote 10 minút. Pridáme 80 µl redestilovanej vody a 5 minút inkubujeme pri izbovej teplote mimo magnet.

Takto prečistené vzorky analyzujeme na genetickom analyzátore ABI 3730xl DNA. Po osekvenovaní zostavíme sekvencie jednotlivých vzoriek v programe DNA Baser (www.dnabaser.com).

4.6 Analýza teplotných kriviek DNA (HRM)

Túto metódu som použila na detekciu SNPs pomocou 7 párov primerov, konkrétne Lp260, Lp290, Lp300, Lp310, Lp350, Lp560 a Lp810. Na analýzu HRM si pripravíme premix podľa tabuľky 8.

Tab. 8 Zloženie premixu, objem na 1 vzorku.

Chemikálie	Objem (μl)
Sso Fast supermix	10
Primery R+F	0,1+0,1
dH ₂ O	6,8
DNA	3

DNA napipetujeme do 96 jamkovej MicroAmp doštičky, pridáme premix a premiestnime do cykléru. Použitý teplotný protokol sa nachádza pod textom. Výsledky som spracovala programom Melt AnalysisTM Software (Bio – Rad).

Protokol

1: 98,0°C for 2:00 min

2: 98,0°C for 0:05 sec

3: 60,0°C for 0:20 sec

4: 72,0°C for 0:20 sec

Plate Read

5: GOTO 2, 30 more times

6: 72,0°C for 5:00 min

7: Melt Curve 65,0°C to 95,0°C: Increment 0,2°C 0:05 sec

4.7 Zoznam použitých chemikálií

- Agaróza (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleozid trifosfáty dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Fermentas, Litva)
- Ethanol – 96% roztok (Lachema, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma Chemical, USA)
- ExoSap-IT® (Affymetrix, USA)
- Exonukleáza I (Fermentas, Kanada)
- PCR primery (Invitrogen; Sigma-Aldrich)
- Proteináza K
- Taq polymeráza
- Termosensitívna alkalická fosfatáza FastAP (Fermentas, Kanada)
- Veľkostný marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas)

4.8 Použité pufrы a komerčné kity

- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitex, Nemecko)
- Sso Fast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

10 x PCR pufor

- 100 mM Tris-HCl pH 8,8
- 15 mM MgCl₂
- 500 mM KCl
- 1% Triton X-100

0,5 x TBE pufor (pH 8)

- 45 mM Tris báza
- 45 mM kyselina boritá
- 1 mM EDTA

Cresol Red (100 ml)

- 7,5 g sacharóza
- 50 mg Cresol Red
- doplniť do 100 ml H₂O

4.9 Vybavenie laboratória

- MicroAmp® Optical 96-kapilárový sekvenátor 3730xl DNA analyzér (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Biologický termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Bioimaging System s transiluminátorom model GVM20 (Syngene, GB)
- Homogenizačný oscilačný mlyn MM301 (Retsch, Nemecko)
- Magnetická doštička 96 DIRECT INJECT MAGNET (Beckman Coulter, USA)
- Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Multifunkčná centrifúga JOUAN CR3i Multifunction Centrifuge
- Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop®
- Stolná centrifúga IEC Micromax RF (Thermo Scientific, USA)
- Termocyklér C1000 Thermal Cyclor (Bio-Rad, USA)

5 Výsledky

Vo svojej diplomovej práci som celkovo otestovala 60 párov primerov, navrhnutých z dostupných DArT markerov, na 85 odrodách druhov kostrava lúčna, mätonoh trváci a mätonoh mnohokvetý. Zo všetkých odrôd uvedených v tabuľke 1 som vyzolovala DNA pomocou Invisorb[®] Spin Plant Mini Kitu. Koncentráciu som zmerala na spektrofotometri. Celkovo som z každej odrody získala 80 µl roztoku obsahujúci DNA. Primery som navrhla pomocou programu primer 3 a ich špecifitu som overila pomocou PCR reakcie.

5.1 Hľadanie markerov detekovateľných PCR reakciou

Navrhnuté primery boli testované pomocou metódy PCR na vyzolovanej DNA z 85 odrôd druhov kostravy a mätonohu. PCR reakcie prebehli s teplotou annealingu v rozmedzí od 58 do 61 °C. Vzniknuté produkty som preniesla na 1.5 % agarózový gél, na ktorom prebehla elektroforetická separácia. Doba elektroforetickej separácie bola 60 minút pri napätí 120 V, potom som gél preniesla do etídium bromidu a následne vizualizovala pomocou UV svetla.

Všetkých šesťdesiat párov primerov som otestovala iba na niekoľkých odrodách a to na 18 odrodách kostravy lúčnej, 12 odrodách mätonohu trváceho a 6 odrodách mätonohu mnohokvetého, pričom predpokladaná veľkosť produktov sa pohybovala medzi 200 – 300 bp. Hodnotila som prítomnosť alebo neprítomnosť fragmentu, ktorý určoval, či je daný primer špecifický pre konkrétny druh. Z výsledkov nachádzajúcich sa v tabuľkách 9 a 10 je zrejmé, že po otestovaní všetkých 60 pároch primerov sa o špecifite dá hovoriť u dvoch párov z nich. Avšak iba šesť primerov bolo ďalej testovaných na ostatných 49 odrodách (obr. 8, tab. 11). Primer Lm29 bol pozitívny u 44 odrodách z 56 odrôd mätonohu a negatívny u všetkých odrodách kostravy. Primer Lm24 bol negatívny u všetkých odrôd kostravy a pozitívny u 12 z 18 odrôd mätonohu, ale do ďalších testov nebol zahrnutý preto, lebo sme vybrali také

primery, ktoré podľa našich výsledkov mali byť špecifické pre čo najviac odrôd (tab. 9). V konečnom dôsledku sme určili, že 2 primery vyšli ako špecifické, ale jeden by bolo treba otestovať ešte na viacerých odrodách pre potvrdenie špecifity.

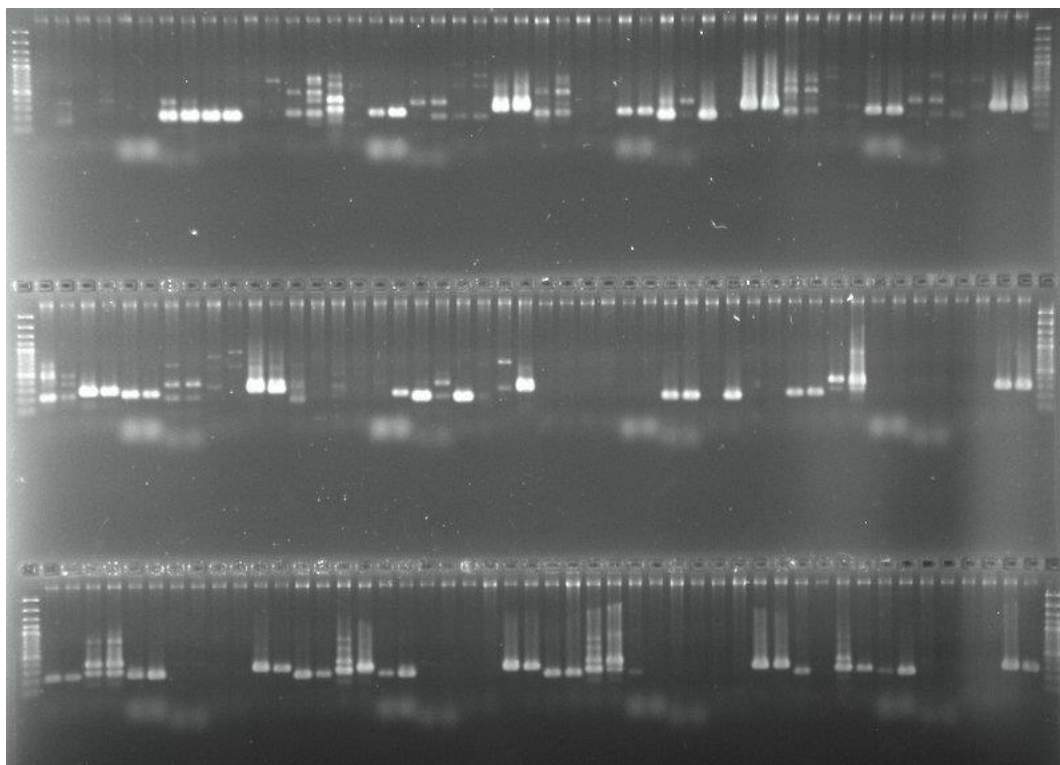
Tab. 9 Výsledky PCR testovania 18 odrôd kostravy lúčnej (*F. pratensis*), 12 odrôd mätonohu trváceho (*L. perenne*) a 6 odrôd mätonohu mnohokvetého (*L. multiflorum*) na 30 pároch navrhnutých primerov, šedé pole – neprítomný produkt, biele pole – prítomný produkt.

Primer	Odrody kostravy lúčnej (<i>Festuca pratensis</i>)	Odrody mätonohu trváceho (<i>Lolium perenne</i>)	Odrody mätonohu mnohokvetého (<i>Lolium multiflorum</i>)
Lm1	■	■	■
Lm2	■	■	■
Lm3	■	■	■
Lm4	■	■	■
Lm5	■	■	■
Lm6	■	■	■
Lm7	■	■	■
Lm8	■	■	■
Lm9	■	■	■
Lm10	■	■	■
Lm11	■	■	■
Lm12	■	■	■
Lm13	■	■	■
Lm14	■	■	■
Lm15	■	■	■
Lm16	■	■	■
Lm17	■	■	■
Lm18	■	■	■
Lm19	■	■	■
Lm20	■	■	■
Lm21	■	■	■
Lm22	■	■	■
Lm23	■	■	■
Lm24	■	■	■
Lm25	■	■	■
Lm26	■	■	■
Lm27	■	■	■
Lm28	■	■	■
Lm29	■	■	■
Lm30	■	■	■

Tab. 10 Výsledky PCR testovania 18 odrôd kostravy lúčnej (*F. pratensis*), 12 odrôd mätonohu trváceho (*L. perenne*) a 6 odrôd mätonohu mnohokvetého (*L. multiflorum*) na 30 pároch navrhnutých primerov, šedé pole – neprítomný produkt, biele pole – prítomný produkt.

Primer	Odrody kostravy lúčnej (<i>Festuca pratensis</i>)	Odrody mätonohu trváceho (<i>Lolium perenne</i>)	Odrody mätonohu mnohokvetého (<i>Lolium multiflorum</i>)
Fp1			
Fp2			
Fp3			
Fp4			
Fp5			
Fp6			
Fp7			
Fp8			
Fp9			
Fp10			
Fp11			
Fp12			
Fp13			
Fp14			
Fp15			
Fp16			
Fp17			
Fp18			
Fp19			
Fp20			
Fp21			
Fp22			
Fp23			
Fp24			
Fp25			
Fp26			
Fp27			
Fp28			
Fp29			
Fp30			

Obr. 8 Elektroforetogram znázorňujúci vzniknuté produkty PCR reakcie, použité boli primery Lm3, Lm5, Lm29, Fp2, Fp12 a Fp30. Teplota annealingu bola 60 °C a čas separácie 60 minút. Produkt vznikol alebo nevznikol podľa toho, ktorý primer sa amplifikoval u ktorej odrody. Použitý bol veľkostný marker GeneRuler 100 bp.



Tab. 12 Presné poradie vzoriek DNA vyizolovaných z odrôd kostravy a mätonohu v géli na obrázku 8. + prítomný a – neprítomný produkt.

	Odroda	Primer			Odroda	Primer	
1.	KL Cosmonaut	Lm3	-	37.	JV Aubisque	Lm3	+
2.	JV Jamaica	Lm3	+	38.	JV Missouri	Lm3	+
3.	KL Cosmonaut	Lm5	-	39.	JV Aubisque	Lm5	-
4.	JV Jamaica	Lm5	+	40.	JV Missouri	Lm5	+
5.	KL Cosmonaut	Lm29	-	41.	JV Aubisque	Lm29	+
6.	JV Jamaica	Lm29	-	42.	JV Missouri	Lm29	+
7.	KL Cosmonaut	Fp2	+	43.	JV Aubisque	Fp2	+
8.	JV Jamaica	Fp2	+	44.	JV Missouri	Fp2	+
9.	KL Cosmonaut	Fp12	+	45.	JV Aubisque	Fp12	+
10.	JV Jamaica	Fp12	+	46.	JV Missouri	Fp12	+
11.	KL Cosmonaut	Fp30	-	47.	JV Aubisque	Fp30	+
12.	JV Jamaica	Fp30	+	48.	JV Missouri	Fp30	+
13.	JV Calibra	Lm3	+	49.	JV Anaconda	Lm3	+
14.	JV Foxtrot	Lm3	+	50.	JV Tetragreen	Lm3	+
15.	JV Calibra	Lm5	+	51.	JV Anaconda	Lm5	+
16.	JV Foxtrot	Lm5	+	52.	JV Tetragreen	Lm5	+
17.	JV Calibra	Lm29	+	53.	JV Anaconda	Lm29	+
18.	JV Foxtrot	Lm29	+	54.	JV Tetragreen	Lm29	+
19.	JV Calibra	Fp2	+	55.	JV Anaconda	Fp2	+
20.	JV Foxtrot	Fp2	+	56.	JV Tetragreen	Fp2	+
21.	JV Calibra	Fp12	+	57.	JV Anaconda	Fp12	+
22.	JV Foxtrot	Fp12	+	58.	JV Tetragreen	Fp12	-
23.	JV Calibra	Fp30	+	59.	JV Anaconda	Fp30	+
24.	JV Foxtrot	Fp30	+	60.	JV Tetragreen	Fp30	+
25.	JV Indiana	Lm3	+	61.	KL Petrarca	Lm3	+
26.	JV Option	Lm3	+	62.	JV Twystar	Lm3	-
27.	JV Indiana	Lm5	-	63.	KL Petrarca	Lm5	-
28.	JV Option	Lm5	-	64.	JV Twystar	Lm5	-
29.	JV Indiana	Lm29	+	65.	KL Petrarca	Lm29	-
30.	JV Option	Lm29	+	66.	JV Twystar	Lm29	+
31.	JV Indiana	Fp2	+	67.	KL Petrarca	Fp2	+
32.	JV Option	Fp2	+	68.	JV Twystar	Fp2	+
33.	JV Indiana	Fp12	+	69.	KL Petrarca	Fp12	+
34.	JV Option	Fp12	-	70.	JV Twystar	Fp12	-
35.	JV Indiana	Fp30	+	71.	KL Petrarca	Fp30	+
36.	JV Option	Fp30	+	72.	JV Twystar	Fp30	+

Pokračovanie tabuľky 12

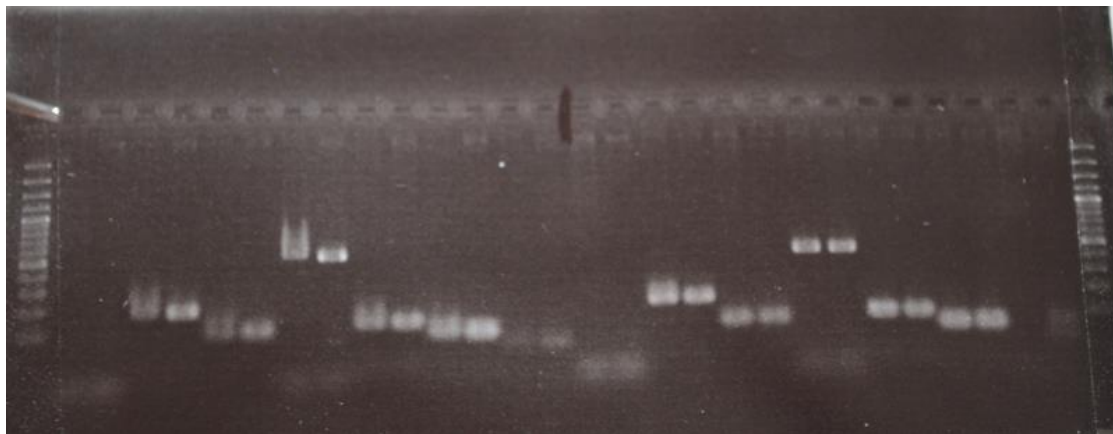
	Odroda	Primer			Odroda	Primer	
73.	KL Dedinovskaya	Lm3	-	109.	JM Undine	Lm3	+
74.	KL Laura	Lm3	-	110.	JM Tigris	Lm3	+
75.	KL Dedinovskaya	Lm5	-	111.	JM Undine	Lm5	+
76.	KL Laura	Lm5	-	112.	JM Tigris	Lm5	+
77.	KL Dedinovskaya	Lm29	-	113.	JM Undine	Lm29	+
78.	KL Laura	Lm29	-	114.	JM Tigris	Lm29	+
79.	KL Dedinovskaya	Fp2	+	115.	JM Undine	Fp2	-
80.	KL Laura	Fp2	+	116.	JM Tigris	Fp2	-
81.	KL Dedinovskaya	Fp12	-	117.	JM Undine	Fp12	-
82.	KL Laura	Fp12	+	118.	JM Tigris	Fp12	-
83.	KL Dedinovskaya	Fp30	-	119.	JM Undine	Fp30	+
84.	KL Laura	Fp30	-	120.	JM Tigris	Fp30	+
85.	JM Podium	Lm3	+	121.	JM Rangifer	Lm3	+
86.	JM Taurus	Lm3	+	122.	Jm Itaka	Lm3	+
87.	JM Podium	Lm5	+	123.	JM Rangifer	Lm5	+
88.	JM Taurus	Lm5	+	124.	Jm Itaka	Lm5	+
89.	JM Podium	Lm29	-	125.	JM Rangifer	Lm29	+
90.	JM Taurus	Lm29	-	126.	Jm Itaka	Lm29	-
91.	JM Podium	Fp2	-	127.	JM Rangifer	Fp2	-
92.	JM Taurus	Fp2	-	128.	Jm Itaka	Fp2	-
93.	JM Podium	Fp12	-	129.	JM Rangifer	Fp12	-
94.	JM Taurus	Fp12	-	130.	Jm Itaka	Fp12	-
95.	JM Podium	Fp30	+	131.	JM Rangifer	Fp30	+
96.	JM Taurus	Fp30	+	132.	Jm Itaka	Fp30	+
97.	JM Salome	Lm3	+	133.	JM IS LMT 15	Lm3	+
98.	JM Melchior	Lm3	+	134.	JM Inducer	Lm3	-
99.	JM Salome	Lm5	+	135.	JM IS LMT 15	Lm5	+
100.	JM Melchior	Lm5	+	136.	JM Inducer	Lm5	+
101.	JM Salome	Lm29	+	137.	JM IS LMT 15	Lm29	+
102.	JM Melchior	Lm29	+	138.	JM Inducer	Lm29	+
103.	JM Salome	Fp2	-	139.	JM IS LMT 15	Fp2	-
104.	JM Melchior	Fp2	-	140.	JM Inducer	Fp2	-
105.	JM Salome	Fp12	-	141.	JM IS LMT 15	Fp12	-
106.	JM Melchior	Fp12	-	142.	JM Inducer	Fp12	-
107.	JM Salome	Fp30	+	143.	JM IS LMT 15	Fp30	+
108.	JM Melchior	Fp30	+	144.	JM Inducer	Fp30	+

5.2 Hľadanie SNP markerov

Vzhľadom k tomu, že sa podarilo identifikovať 2 druhovo špecifické markery, použiteľné pomocou PCR, sme sa rozhodli ešte nájsť SNP markery osekvenovaním produktov u troch vybraných primerov a dvoch diploidných odrôd, Kolumbus od kostravy lúčnej a Abermagic od mätonohu trváceho. Každý produkt bol osekvenovaný pätnásťkrát, aby som získala dostatočnú hĺbku čítania a mala 95% pravdepodobnosť, že nájdené SNP varianty budú homogénne.

K dispozícii som dostala 7 párov nových primerov navrhnutých na SNP markery zo sekvenačných dát transkriptómu kostravy lúčnej, odrody WESTA a mätonohu trváceho, odrody MITOS v Centre pre funkčnú a štruktúrnu genomiku rastlín. Špecifitu týchto primerov som overila pomocou metódy PCR (obr. 9, tab. 13). U piatich zo siedmich primerov bola veľkosť produktu amplifikácie väčšia, než ako bola navrhnutá. Vzhľadom k tomu, že boli primery navrhnuté pomocou sekvencií transkriptómu, s veľkou pravdepodobnosťou muselo u týchto primerov dôjsť k amplifikáciám intrónových oblastí a tým zväčšeniu výsledného produktu. Výhodou by to bolo vtedy, pokiaľ by tieto intróny boli druhovo špecifické, čo sa však nepotvrdilo. Ostatné dva primery boli použité na overenie SNP markerov pomocou metódy HRM, ktorou som analyzovala 12 odrôd, šesť z každého rodu. V tomto prípade výsledky HRM analýzy (grafy 1 – 4, tab. 14, 15) nedokázali identifikovať SNP markery. Preto by bolo potrebné navrhnuť nové primery, použiť väčšiu populáciu odrôd oboch rodov a overiť jedinečnosť oblastí, na ktoré boli primery navrhnuté.

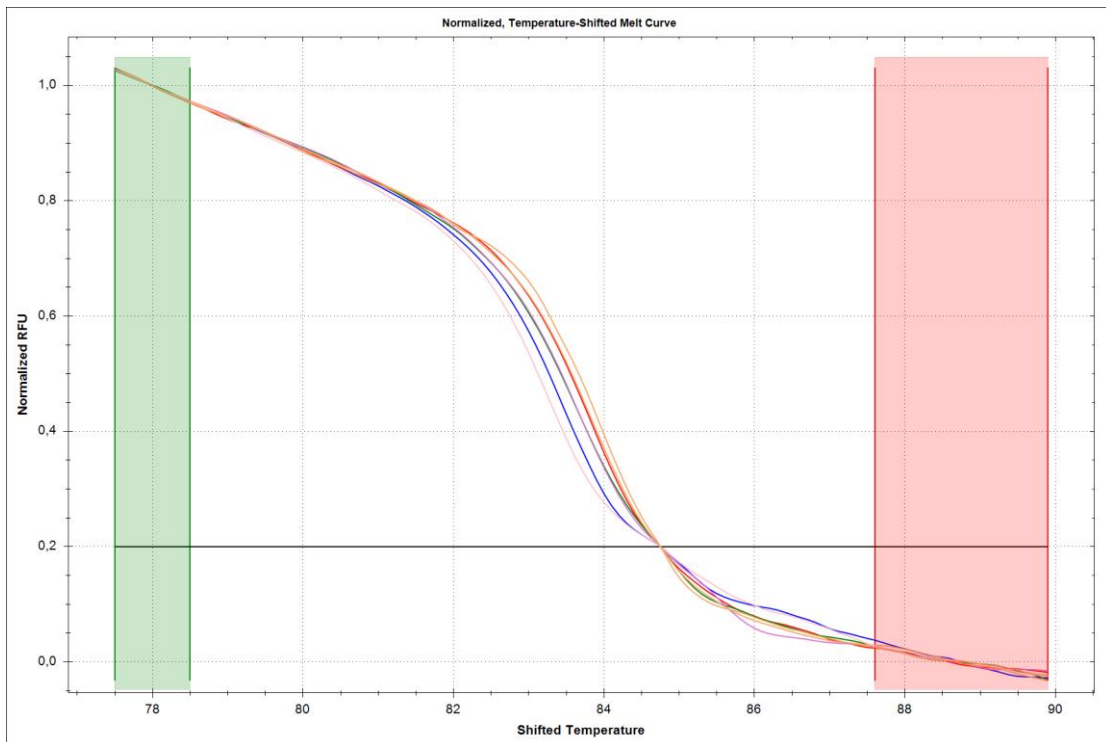
Obr. 9 Elektroforetogram znázorňujúci vzniknuté produkty PCR reakcie použitím primerov Lp260, Lp290, Lp300, Lp310, Lp350, Lp560 a Lp810. Teplota annealingu bola 60 °C a čas separácie 60 minút. Použitý bol veľkostný marker GeneRuler 100 bp.



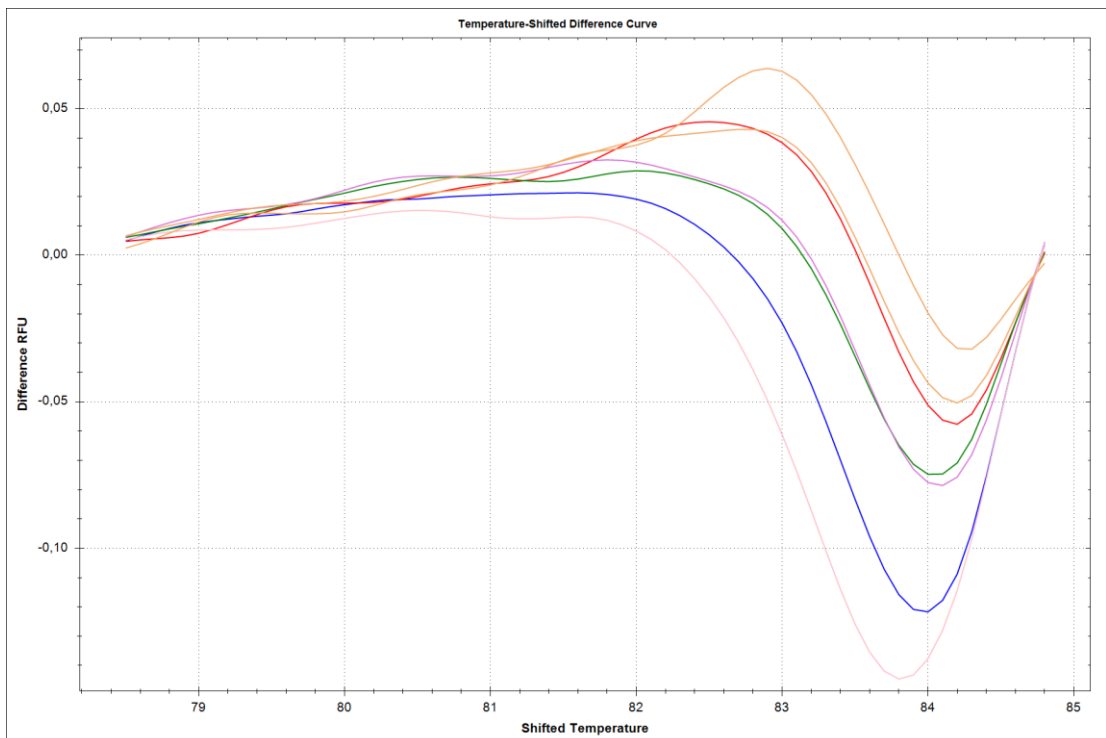
Tab. 13 Presné poradie vzoriek DNA odrôd kostravy a mätonohu v géli na obrázku 9. +prítomný a – neprítomný produkt.

	Odroda	Primer			Odroda	Primer	
1.	KL Fure	Lp260	-	15.	JV Aston Energy	Lp260	-
2.	KL Raskila	Lp260	-	16.	JV Abermagic	Lp260	-
3.	KL Fure	Lp290	+	17.	JV Aston Energy	Lp290	+
4.	KL Raskila	Lp290	+	18.	JV Abermagic	Lp290	+
5.	KL Fure	Lp300	+	19.	JV Aston Energy	Lp300	+
6.	KL Raskila	Lp300	+	20.	JV Abermagic	Lp300	+
7.	KL Fure	Lp310	+	21.	JV Aston Energy	Lp310	+
8.	KL Raskila	Lp310	+	22.	JV Abermagic	Lp310	+
9.	KL Fure	Lp350	+	23.	JV Aston Energy	Lp350	+
10.	KL Raskila	Lp350	+	24.	JV Abermagic	Lp350	+
11.	KL Fure	Lp560	+	25.	JV Aston Energy	Lp560	+
12.	KL Raskila	Lp560	+	26.	JV Abermagic	Lp560	+
13.	KL Fure	Lp810	-	27.	JV Aston Energy	Lp810	-
14.	KL Raskila	Lp810	-	28.	JV Abermagic	Lp810	-

Graf 1. Normalizované teplotné krivky použitím primeru Lp560 s obmedzením teplotného intervalu na 78,5°C – 87,6°C.



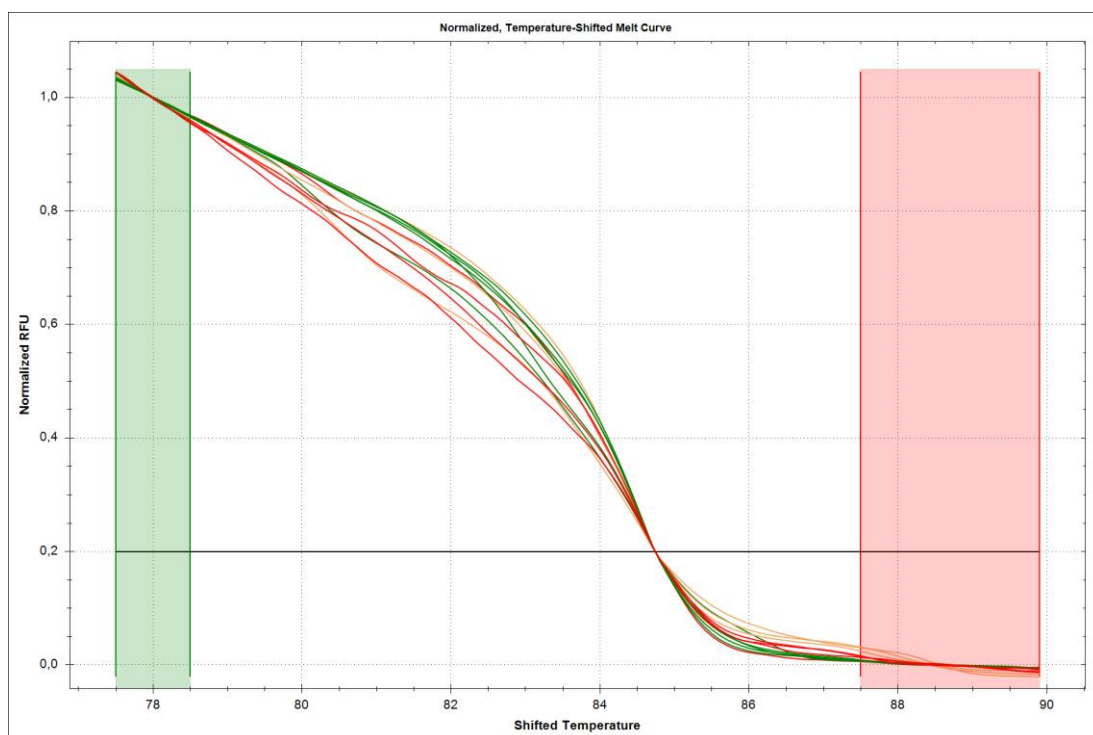
Graf 2. Priebeh teplotných kriviek PCR produktov 6 odrôd, použitý primer Lp560.



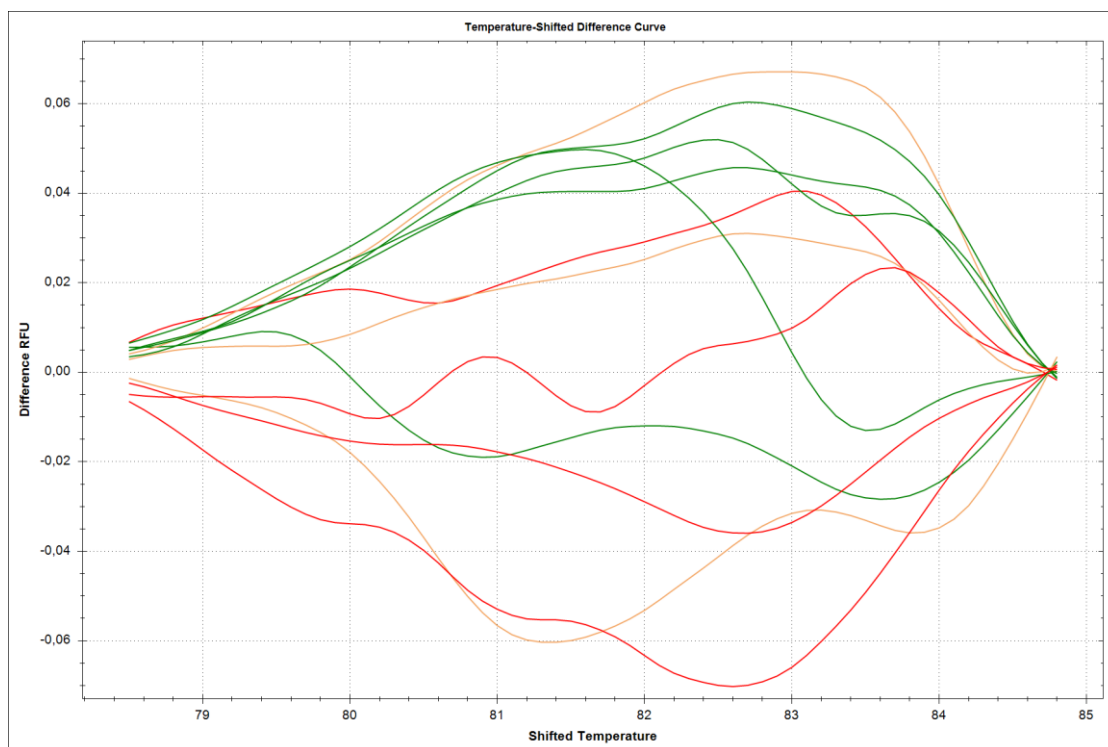
Tab.14 Odrody analyzované HRM metódou s primerom Lp560 a vzniknuté clustery.

Odroda	Cluster	Teplota tavenia (°C)
Paradus – kostrava	-	-
Fure – kostrava	-	-
Cosima – kostrava	3	-
Norild – kostrava	4	-
Westa – kostrava	-	-
Jamaica – kostrava	3	80,8
Foxtrot – mätonoh	5	79,8
Indiana – mätonoh	7	80,2
Podium – mätonoh	6	80
Taurus – mätonoh	3	-
Mitos – mätonoh	-	-

Graf 3. Normalizované teplotné krivky použitím primeru Lp810 s obmedzením teplotného intervalu na 78,5°C – 87,5°C.



Graf 4. Priebeh teplotných kriviek PCR produktov 6 odrôd, použitý primer Lp810.



Tab.15 Odrody analyzované HRM metódou s primerom Lp810 a vzniknuté clustery.

Odroda	Cluster	Teplota tavenia (°C)
Paradus – kostrava	2	-
Fure – kostrava	2	-
Cosima - kostrava	1	86,6
Norild – kostrava	1	86,8
Westa – kostrava	1	86,8
Jamaica – kostrava	1	86,8
Foxtrot – mätonoh	3	86,2
Indiana – mätonoh	3	86,2
Podium – mätonoh	3	86,4
Taurus – mätonoh	1	86,8
Mitos – mätonoh	2	86,6

6 Diskusia

Trávy sú v súčasnosti študované najmä pre ich široké využitie v oblastiach poľnohospodárstva a bežné využitie vo výsadbe trávnikov pre rôzne účely. Kostrava je odolná voči biotickému a abiotickému stresu, mätonoh poskytuje vysoké výnosy krmiva a semien a preto vzniknutí kríženci majú vlastnosti, ktoré sú výhodné pre ich ďalšie použitie. Genomická štruktúra týchto krížencov je variabilná a dostupné metódy na ich analýzu sú zdĺhavé a drahé alebo inak nevýhodné. Cieľom tejto práce bolo z dostupných DArT sekvencií tráv navrhnúť primery vhodné na odvodenie druhovo špecifických markerov a overenie ich špecifity pomocou PCR reakcie. Preto sme sa rozhodli skúsiť vytvoriť jednoduchú, lacnú a rýchlu metódu, ktorou by sme mohli týchto krížencov analyzovať.

Amplifikovala som všetkých šesťdesiat navrhnutých párov primerov s koncentráciou 1 μM na vyizolovanej DNA z odrôd tráv, ktorej koncentrácia bola 20 ng/ μl . V PCR reakcii som použila teplotu annealingu 60 °C. Takáto teplota bola použitá v práci Studer et al. (2008), v ktorej ju ale použili na hľadanie polymorfných SSR markerov. Pre odvodenie SSR markerov boli použité EST sekvencie a testované na 6 odrodách mätonohu trváceho a dvoch odrodách mätonohu mnohokvetého. Vybrali 744 mikrosatelitov, z ktorých sa 464 úspešne amplifikovalo a 143 bolo polymorfných. 306 mikrosatelitov poskytlo špecifický produkt, vďaka čomu mohli byť použité na mapovanie génu VrnA.

V mojej práci som otestovala všetky primery na 18 odrodách kostravy lúčnej, 12 odrodách mätonohu trváceho a 6 odrodách mätonohu mnohokvetého a určili sme 7 primerov, u ktorých sme predpokladali, že by mohli byť druhovo špecifické, ale testovaním na ďalších 49 odrodách sa špecifita potvrdila iba u 1 zo 6 testovaných primerov. Ako špecifické sme považovali tie odrody, ktoré sú negatívne u všetkých odrôd jedného druhu a pozitívne u väčšiny odrôd druhého druhu. U primeru Lm24 (tab. 9) bola takisto pozorovaná špecifita, lebo poskytol produkt u 12 odrodách mätonohu z 18 testovaných a u 18 odrôd kostravy bol negatívny, ale napriek tomu nebol ďalej použitý pre analýzu na ostatných 49 odrodách, lebo sme prvotne použili primery, u ktorých sme podľa výsledkov predpokladali špecifitu u väčšieho množstva odrôd. V budúcnosti by mal byť zahrnutý do ďalšej analýzy. Ďalšia špecifita u mnou navrhnutých primeroch sa bohužiaľ nepotvrdila aj napriek tomu, že boli navrhnuté

z DArT markerov, ktoré by mali byť špecifické. Mohlo to byť spôsobené faktom, že som otestovala málo primerov, preto by bolo vhodné navrhnúť väčšie množstvo primerov. Najlepšie by bolo navrhnúť primery zo všetkých dostupných DArT markerov a otestovať ich špecifitu. Keďže sa mi podarilo nájsť 5 špecifických primerov vyskúšala som ešte metódu analýzy kriviek teploty tavenia DNA (HRM). Touto metódou je možné odhaliť polymorfizmus pomocou mikrosatelitov a SNPs alebo hľadať nové SSR a SNP markery. Vo svojej práci som túto metódu použila práve na hľadanie SNPs, ktoré by boli špecifické pre kostravu lúčnu, mätonoh mnohokvetý a mätonoh trváci. Zaviesť analýzu pomocou SNP markerov by bolo výhodné najmä pre nízke náklady, jednoduchosť použitia a rýchlosť identifikácie krížencov *Festulolium*. Zaoberala som sa nimi aj z toho dôvodu, že sú v našom laboratóriu intenzívne študované. A aj keď sa mi nepodarilo metódou HRM nájsť SNP markery, je táto metóda bežne využívaná na detekciu SNP markerov u rastlín o čom svedčia nižšie uvedené citácie z prác.

V práci Oliver et al. (2011) analyzovali 301 SNP markerov, z ktorých 96 bolo vybratých pre HRM analýzu a 52 bolo polymorfných. 36 SNP markerov použili na hodnotenie genetickej diverzity 34 odrôd ovsu siateho (*Avena sativa* L.). Ja som HRM metódou analyzovala 12 odrôd, 6 od kostravy a 6 od mätonohu. K dispozícii som mala 7 nových primerov, s ktorými sa v našom laboratóriu pracuje. Boli navrhnuté tak, aby vzniknutý produkt mal menej ako 100 bp a dĺžka primerov bola do 25 bp. Použila som takmer rovnaký teplotný profil ako vo vyššie uvedenej práci. Rozmedzie teplôt, pri ktorých sa merala fluorescencia bolo 65 – 95 °C. Teplota sa zvyšovala o 0,2 °C každú 0,05 sekundu a teplotu annealingu som vybrala 60 °C, lebo pri tejto teplote mnou použité primery poskytli produkt na agarózovom géli. Avšak použité primery sa ukázali ako nevhodné pre tento typ analýzy tým, že sú navrhnuté z cDNA sekvencií, čo znamená, že sa do tejto sekvencie mohol dostať intrón. To by bolo výhodné vtedy, pokiaľ by tento intrón bol špecifický a tak by sa dal použiť ako marker. V práci Studer et al. (2009) použili metódu HRM na výber SNP a SSR markerov z F2 populácie mätonohu trváceho. Tieto markery potom použili na zamapovanie génu *VrnA*, ktorý je zodpovedný za vernalizáciu u mätonohu trváceho. Teplota annealingu pre navrhnuté SNP primery bola 63 a 69 °C a pre SSR primer 63 °C. Fluorescencia bola meraná medzi teplotami 70 – 90 °C, kde sa teplota zvyšovala vždy o 0,05 °C každú sekundu.

HRM metódu použili na určenie homozygotov a heterozygotov v pripravených vzorkách Mader et al. (2008). Analyzovali 3 sety vzoriek. Prvý set obsahoval vzorky jedincov pamajoránu (*Origanum onites* L.), druhý set zahŕňal vzorky jedincov majoránu záhradného (*Origanum majorana* L.) a tretí set vzoriek obsahoval jedincov z oboch vyššie uvedených druhov. Použili 2 mikrosatelity z práce Novak et al. (2008), ktorých teplota annealingu bola 60 °C. Teplotný profil HRM analýzy bol v rozmedzí 70 – 90 °C, teplota sa zvyšovala o 0,05 °C každú sekundu. Pre overenie správnosti tejto metódy pripravené vzorky aj osekvenovali. Použili reakciu ExoSap na prečistenie PCR produktu a BigDye sekvenačnú reakciu. Túto istú metodiku sekvenácie som použila aj ja na osekvenovanie dvoch diploidných odrôd Kolumbus od kostravy lúčnej a Abermagic od mätonohu trváceho, u ktorých som hľadala prítomnosť SNP markerov. Vybrala som si mnou navrhnuté 3 primery, ktoré som použila aj pre hľadanie PCR markerov. Sekvenovaním som však neodhalila žiadne špecifické SNPs.

Pre ďalšie testy týchto tráv by bolo vhodné skúsiť použiť mikrosatelity, ktoré sa osvedčili v mnohých prácach. U mätonohu boli mikrosatelity použité v práci Anhalt et al. (2008). Testovali 267 mikrosatelitov navrhnutých inými autormi (Gill et al., 2006; Jensen et al., 2005; Jones et al., 2001; Kubik et al., 2001; Lauvergeat et al., 2005; Studer et al., 2007; Warnke et al., 2004). Skúmané boli na jedincoch z F1 a F2 populácie, z ktorých 70 bolo polymorfných a z nich 65 použili na konštrukciu genetickej mapy. Teplota annealingu nebola v práci uvedená.

Pre ďalšiu analýzu by bolo vhodnejšie zamerať sa na hľadanie SSR alebo SNP markerov u týchto druhov tráv, ktoré podľa vyššie uvedených publikácií majú väčšiu úspešnosť.

7 Záver

Cieľom mojej diplomovej práce bolo navrhnúť jednoduchú a spoľahlivú metódu pre identifikáciu medzidruhových krížencov kostravy a mätonohu. Predpokladom bolo nájsť markery špecifické pre rody *Festuca* a *Lolium* pomocou PCR reakcie, ktoré by bolo možné využiť pri identifikácii medzidruhových krížencov *Festulolium*. Celkovo som otestovala 60 párov primerov navrhnutých z dostupných sekvencií DArT markerov na 36 odrodách druhov kostravy lúčnej, mätonohu trváceho a mätonohu mnohokvetého. Jeden primer bol špecifický pre takmer všetky odrody mätonohu, do ďalších testov však nebol zahrnutý, lebo sme cielene použili primery s väčšou predpokladanou špecifitou na základe získaných výsledkov. Vybrala som 6 párov primerov, ktoré vyzerali nádejne, a ich otestovaním na ďalších 49 odrodách som získala PCR produkty u 1 primeru, ktorý sa javil ako špecifický pre jednotlivé druhy rodov *Festuca* a *Lolium* a mohol by byť použitý ako PCR marker.

Tým, že som získala iba 2 špecifické PCR markery sme sa rozhodli zahrnúť SNP markery do tejto práce, lebo sa im v našom laboratóriu venuje vysoká pozornosť. Ich výhodou je nenáročná metodika a rýchlosť použitia, vyšší počet v genóme a výraznejšie nie sú ovplyvnené mutáciami a preto by sa dali použiť na identifikáciu druhov tráv. Pre zistenie SNP markerov som osekvenovala produkty z vybraných 3 primerov, použitých pri hľadaní PCR markerov. Ako ďalšiu metódu na zistenie SNPs som použila HRM, ktoré boli identifikované zo sekvenančných dát transkriptómu *Festuca* a *Lolium*. Z navrhnutých siedmich primerov som vybrala dva a analyzovala ich na 6 odrodách kostravy a mätonohu, avšak ani v tomto prípade som nezískala relevantné výsledky. Pre ďalšiu analýzu by bolo vhodnejšie navrhnúť primery zo všetkých dostupných DArT markerov a hľadať SNP alebo SSR markery, čo potvrdzujú publikované výsledky uvedené v literárnej rešerši, výsledkoch a diskusií.

8 Použité skratky

AFLP	dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
BC1	prvá generácia vzniknutá spätným križením
BC2	druhá generácia vzniknutá spätným križením
bp	pár bází (<i>base pairs</i>)
DArT	Diversity Arrays Technology
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ddNTPs	deoxyribonukleozid trifosfát
dsDNA	dvojreťazcová DNA
rDNA	ribozomálna DNA
F1	prvá filiálna generácia
F2	druhá filiálna generácia
FISH	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizácia
ITS	transkribovaný medzerník (<i>internal transcribed spacer</i>)
Mb	milión párov bází (<i>mega base pairs</i>)
PCR	polymerázová reťazová reakcia
RAPD	náhodne amplifikovaná polymorfna DNA (<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>)

RFLP	dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SNPs	jednonukleotidový polymorfizmus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SBE	single – base extension
SSRs	jednoduché opakujúce sa sekvencie (<i>simple sequence repeat</i>)
T _a	teplota annealingu
QTL	Quantitative trait loci

9 Zoznam použitej literatúry

Alm V, Fang C, Busso CS, Devos KM, Vollan K, Grieg Z, Rognli OA (2003) A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theor Appl Genet* 108: 25 – 40.

Anhalt UCM, Heslop-Harrison P, Byrne S, Guillard A, Barth S (2008) Segregation distortion in *Lolium*: evidence for genetic effects. *Theor. Appl. Genet.* 117, 297 – 306.

Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard* 82: 247 – 277.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York.

Bernat M, Titos E, Clària J (2002) Rapid identification of single nukleotide polymorphisms by fluorescence-based capillary electrophoresis, *Genet. Mol. Res.* 1: 72 – 78.

Bolaric S, Barth S, Melchinger AE, Posselt UK (2005) Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. *Plant Breed.* 124: 257 – 262.

Cagaš B (2010) *Trávy pěstované na semeno*, Vydavatelství Ing. Petr Baštan.

Carnahan HL, Hill HD (1961) Cytology and genetics of forage grasses. *Botanic Review* 27: 1 – 167.

Catalan P, Torrecilla P, Rodriguez JAL, Olmstead RG (2004): Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poaeae, Pooideae) inferred from ITS and *trnL*-F sequences. *Mol Phylogenet Evol* 31: 517 – 541.

Clayton WD, Renvoize SA (1986): *Genera graminum: Grasses of the World*. Kew Bull, Add Ser 13: 1 – 389.

Comal L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Henikoff S (2004) Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *The Plant Journal* 37: 778 – 786.

Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504 – 509.

Dobrowolski S, Gray J, Miller T, Sears M (2009) Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling, *Hum Mutat* 30: 891 – 898.

Egan AN, Schlueter J, Spooner DM (2012) Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot.* 99: 175 – 185.

Ehrich M, Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Oeth P, Nelson MR, Cantor CR, van den Boom D (2006) Cytosine methylation profiles as a molecular marker in non-small cell lung cancer, *Cancer Research* 66: 10911 – 10918.

Eizenga GC, Buckner RC (1986) Cytological and isozyme Evaluation of Tall Fescue × Italian Ryegrass Hybrids. *Plant Breeding* 97: 340 – 344.

Erali M, Voelkerding VK, Wittwer TC (2008) High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. *Exp Mol Pathol.* 85: 50 – 58.

Evans GM, Rees H, Snell CL, Sun S (1972): The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle, *Chromosomes Today* 3: 24 – 31.

Field D, Wills C (1998) Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 263: 209 – 215.

Fojtik A (1994) Methods of grass improvement used at the Plant Breeding Station Hladké Životice. *Genet. Pol.* 35A: 25 – 31.

Gaut BS, Tredway LP, Kubik C, Gaut RL (2000) Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Plant Syst. Evol.* 224: 33 – 53.

Ghesquière M, Humphreys MW, Zwierzykowski Z (2010) *Festulolium*, Fodder Crops and Amenity Grasses, Handbook of Plant Breeding Volume 5: 288 – 311.

Gibson G, Muse SV (2009) A Primer of Genome Science, 3rd edition, USA

Gill GP, Wilcox DJ, Whittaker DJ, Winz RA, Bickersta VP, Echt CE, Kent J, Humphreys MO, Elborough KM, Gardner RC (2006) A framework linkage map of perennial ryegrass based on SSR markers. *Genome* 49: 354 – 364.

Hand ML, Ponting RC, Drayton MC, Lawless KA, Cogan NOI, Brummer E CH, Sawbridge TI, Spangenberg GC, Smith KF, Forster JW (2008) Identification of homologous, homoeologous and paralogous sequence variants in an outbreeding allopolyploid species based on comparison with progenitor taxa, *Mol Genet Genomics* 280: 293 – 304.

Hand ML, Cogan NO, Stewart AV, Forster JW (2010) Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium – Festuca* species complex. *BMC Evolutionary Biology* 10: 303 – 320.

Haynes JL (1988) Principles of Flow Cytometry, *Cytometry Supplement* 3: 7 – 17.

Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66: 411 – 453.

Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB (1995) Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theor Appl Genet* 90: 389 – 398.

<http://luirig.altervista.org/naturaitaliana/viewpics2.php?rcn=34393> 13.1.2014.

http://www.biopix.com/meadow-fescue-festuca-pratensis_photo-12154.aspx 13.1.2014.

<http://www.biosurvey.ou.edu/okwild/perrye.html> 13.1.2014.

<http://www.gene-quantification.de/hrm-path-utah.gif> 5.3.2014.

http://chestofbooks.com/flora-plants/weeds/Fodder-Pasture-Plants/Perennial-Rye-Grass-Lolium-Perenne-L.html#.UznKlfl_tZ8 31.3.2014.

<http://irapl.altervista.org/flora-italiana/index.php?taxanorm=lolium+perenne> 31.3.2014.

http://soilcropandmore.info/crops/Grasses/Tall_fescue/Tall-Fescue-Festuca-arundinacea.htm 31.3.2014.

<http://www.di.uq.edu.au/proj19proc> 2.4.2014.

<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html> 2.4.2014

Humphreys MO (1989) The controlled introgression of *Festuca arundinacea* genes into *Lolium multiflorum*, Euphytica 42: 105 – 116.

Charmet G, Balfourier F (1994) Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Gramineae). Theor Appl Genet 87: 641 – 649.

Chen C, Sleper DA, West CP (1995) RFLP and Cytogenetic Analyses of Hybrids between *Festuca mairei* and *Lolium perenne*, Crop Science Society of America, 35, 3: 720 – 725.

Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Res. 15: E25.

Jauhar PP(1993) Cytogenetics of the *Festuca – Lolium* complex: relevance to Breeding. Monographs on Theor Appl Genet Vol. 18, pp 255 (Springer-Verlag, Berlin).

Jensen LB, Muylle H, Arsen P, Andersen CH, Holm PB, Ghesquiere M, Julier B, Lübberstedt T, Nielsen K, de Riek J, Róldan-Ruiz I, Roulund N, Taylor C, Vosman B, Barre P (2005) Development and mapping of a public references set of SSR markers in *Lolium perenne* L. Mol Ecol Notes 5: 951 – 958.

Jones ES, Dupal MP, Kölliker R, Drayton MC, Forster JW (2001) Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theor Appl Genet 102: 405 – 415.

Kerlan MC, Ghesquière M (1997) Use of cytometer in breeding *Festuca x Lolium* hybrids. Proceedings of the XVIII International Grassland Congress, Winnipeg, Manitoba, Canada, 97 – 98.

King IP, Morgan WG, Armstead IP, Harper JA, Hayward MD, Bollard A, Nash JV, Forster JW, Thomas HM (1998) Introgression mapping in the grasses. I. Introgression of *Festuca pratensis* chromosomes and chromosomes segments into *Lolium perenne*, *Heredity* 81: 462 – 467.

Kopecký D, Bartoš J, Christelová P, Černoč V, Kilian A, Doležel J (2011) Genomic constitution of *Festuca x Lolium* hybrids revealed by the DArTFest array. *Theor Appl Genet* 122: 355 – 363.

Kopecký D, Bartoš J, Lukaszewski AJ, Baird JH, Černoč V, Kölliker R, Rognli AO, Blois H, Caig V, Lübberstedt T, Studer B, Shaw P, Doležel J, Kilian A (2009) Development and mapping of DArT markers within the *Festuca - Lolium* complex. *BMC Genomics* 10: 473.

Kopecký D, Havránková M, Loureiro J, Castro S, Lukaszewski AJ, Bartoš J, Kopecká J, Doležel J (2010) Physical distribution of homoeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. *Cytogenetic and genome research* 129: 162 – 172.

Kopecký D, Loureiro J, Zwierzykowski Z, Chesquière M, Doležel J (2006) Genome constitution and evolution in *Lolium X Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theor Appl Genet* 113: 731 – 742.

Kopecký D, Lukaszewski AJ, Doležel J (2008): Cytogenetics of Festulolium (*Festuca x Lolium*), *Cytogenetic and Genome Research* 120: 370 – 383.

Kosmala A, Skibińska M, Zwierzykowski Z, Humphreys MW, Rapacz M, Jokš W (2003) Introgression of genes for abiotic stress resistance from *Festuca pratensis* and *F. arundinacea* into *Lolium multiflorum* germplasm. *Votr. Pflanzenzüchtg* 59: 225 – 231.

Kubik C, Sawkins M, Meyer WA, Gaut BS (2001) Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Sci* 41: 1565 – 1572.

Lauvergeat V, Barre P, Bonnet M, Ghesquière M (2005) Primer note. Sixty simple sequence repeats (SSR) markers for use in the *Festuca/Lolium* complex of grasses. *Mol Ecol Notes* 5: 401 – 405.

- Lehmensiek A, Sutherland MW, McNamara RB (2008)** The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley, *Theoretical and Applied Genetics* 5: 721 – 728.
- Ma X, Gu XY, Chen TT, Chen SY, Huang LK, Zhang XQ (2013)** Genetic relationships between *Lolium* (Poaceae) species revealed by RAPD markers, *Genet. Mol. Res.* 12, 3: 3246 – 3255.
- Mader E, Lukas B, Novak J (2008)** A Strategy to Setup Codominant Microsatellite Analysis for High-Resolution-Melting-Curve-Analysis (HRM), *BioMed Central Genetics* 9: 69.
- Marie D, Spencer CB (1993)** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species, *Biol. cell.* 78: 41 – 51.
- Mirjalili SA, Bennett SJ and Poorazizi E (2008)** A phenetic analysis on the genus *Lolium* (Poaceae) in Iran. *Plant Sys. Evol.* 274: 203 – 208.
- Momotaz A, Forster JW and Yamada T (2004)** Identification of cultivars and accessions of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium* hybrids through the detection of simple sequence repeat polymorphism. *Plant Breeding* 123: 370 – 376.
- Nilsson F (1940)** The hybrid *Festuca arundinacea* × *F. pratensis* and some of its derivatives. *Botaniska Notiser* 1: 33 – 50.
- Novak J, Lukas B, Bolzer K, Grausgruber G, Degenhardt J (2008)** Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* expressed sequence tag. *Molecular Ecology Resources* 8: 599 – 601.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006)** Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294 – 307.
- Poggio L, Gonzalez G, Confalonieri V, Comas C, Naranjo CA (2005)** The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and FISH-GISH cytogenetic analysis. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 259 – 267.

Program Primer 3 <http://primer3.ut.ee/> 10.9.2012

Regal V, Šindelářová J (1970) Atlas nejdůležitějších trav, Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 245: 154 – 160.

Schifino MT, Winge H (1985) Karyotypes and nuclear DNA content of species of the *Briza* complex and some other genera of Poaceae (Gramineae), *Rev Brazilian Genet* 6: 245 – 259.

Schwarzacher T (2003) DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization, *Genome* 46: 953 – 962.

Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid, *Ann Bot* 64: 315 – 324.

Singh PK, Mergoum M, Adhikari TB, Shah T, Ghavami F, Kianian SF (2010) Genetic and molecular analysis of wheat tan spot resistance effective against *Pyrenophora tritici-repentis* races 2 and 5. *Mol Breed* 25: 369 – 379.

Snustad DP, Simmons MJ (2009) *Genetika*. Muni Press, Brno.

Stammers M, Harris J, Evans GM, Hayward MD (1995) Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity* 74: 19 – 27.

Studer B, Boller B, Herrmann D, Bauer E, Posselt UK, Widmer F, Kölliker R (2006) Genetic mapping reveals a single major QTL for bacterial wilt resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor Appl Genet* 2006,113: 661 – 671.

Studer B, Boller B, Bauer E, Posselt U, Widmer F, Kölliker R (2007) Consistent detection of QTLs for crown rust resistance in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) across environments and phenotyping methods. *Theor Appl Genet*, 115: 9 – 17.

Studer B, Asp T, Frei U, Hentrup S, Meally H, Guillard A, Barth S, Muylle H, Roldán-Ruiz I, Barre P, Koning-Boucoiran C, Uenk-Stunnenberg G, Dolstra O, Skøt L, Skøt KP, Turner LB, Humphreys MO, Kölliker R, Roulund N, Nielsen KK, Lübberstedt T (2008) Expressed Sequence Tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Molecular Breeding 21: 533 – 548.

Studer B, Jensen LB, Fiil A, Asp T (2009) „Blind“ mapping of genic DNA sequence polymorphisms in *Lolium perenne* L. by high resolution melting curve analysis, Mol. Breeding 24: 191 – 199.

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V (2005) Metody molekulární biologie. Vydavatelství MU, Brno.

Thomas HM, Morgan WG, Meredith MR, Humphreys MW, Thomas H, Leggett JM (1994) Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* by genomic *in situ* hybridization, Theor Appl Genet 88: 909 – 913.

Thomas HM, Harper JA, Meredith MR, Morgan WG, King IP (1997) Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by *in situ* hybridization. Genome 40: 406 – 410.

Tóth G, Gáspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. Genome Research 10: 967 – 981.

Vieira EA, Castro CM, Oliveira AC, Irajá F (2004) Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD, Sci. Agric. 61: 407 – 413.

Vossen RHAM, Aten E, Roos A, Dunnen JT (2009) High-Resolution Melting Analysis (HRMA) – More Than Just Sequence Variant Screening, Human Mutation 6: 860 – 866.

Warnke SE, Barker RE, Jung G, Sim S-C, Mian MAR, Saha MC, Brilman LA, Dupal MP, Forster JW (2004) Genetic linkage mapping of annual x perennial ryegrass population. Theor Appl Genet 109: 294 – 304.

Wenzl P, Haobing L, Carling J, Meixue Z, Raman H, Paul E, Hearnden P, Maier Ch, Ling X, Caig V, Ovsená J, Cakir M, Poulsen D, Junping W, Raman R, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chalmers KJ, Kleinhofs A, Huttner E, Kilian A (2006) A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits, *BioMed Central Genomics*, 7: 206.

Wilhelm J, Pingoud A (2003) Real-Time Polymerase Chain Reaction, *ChemBioChem*, 4: 1120 – 1128.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 – 6535.

Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J (2004) *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha.