

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Helena Staňková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mapování genu pro rezistenci k mšici zhoubné (*Diuraphis noxia*)
na chromozómu 7D pšenice**

Diplomová práce

Bc. Helena Staňková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Ing. Hana Šimková, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Ing. Hany Šimkové, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

Dne

Podpis.....

Tímto bych chtěla poděkovat především své školitelce Ing. Haně Šimkové, CSc. za odborné vedení, poskytnutí literatury, ochotu ke konzultacím, trpělivost a cenné rady a připomínky při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Hedě Robert-Quatre za spolupráci a pomoc při provádění laboratorních experimentů a celému kolektivu laboratoře Molekulární cytogenetiky a cytometrie Ústavu experimentální botaniky AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při práci.

Můj dík patří také RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za možnost provedení části experimentů v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky. Děkuji za vstřícný přístup, odbornou pomoc a cenné rady.

Souhrn

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*) je významným škůdcem pšenice seté (*Triticum aestivum*). Linie CI 2401 nese na krátkém rameni chromozómu 7D gen *Dn_{CI2401}*, který podmiňuje rezistenci k tomuto druhu mšice ve formě antibiózy. Předkládaná práce je zaměřena na genetické mapování v oblasti zmíněného genu.

Byly testovány detekční metody vhodné pro vysokokapacitní analýzu genotypu mikrosatelitových markerů v rámci mapovací populace F_{2:3} odvozené z křížení rezistentní linie CI 2401 s citlivou odrůdou Glupro. Byla porovnávána kapilární elektroforéza, elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu a elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Metody byly srovnávány za použití tří mikrosatelitových markerů ve vazbě na gen *Dn_{CI2401}*, jejichž alely se v použité mapovací populaci liší pouze o 2 bp. Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu a kapilární elektroforéza se ukázaly jako metody vhodné pro vysokokapacitní analýzu těchto mikrosatelitových markerů. Tyto dvě metody poskytují srovnatelné rozlišení. Elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu, byla vyhodnocena jako nevhodná pro zmíněný účel z důvodu nedostatečného rozlišení a špatné reprodukovatelnosti výsledků.

Součástí práce bylo dále odvozování nových markerů za účelem zahuštění stávající mapy v okolí studovaného genu. Markery byly odvozovány z BAC klonů z knihovny DNA specifické pro krátké rameno chromozómu 7D (7DS). Na základě znalosti koncových sekvencí sedmi BAC klonů (BES) a kompletních sekvencí čtyř BAC klonů nacházejících se v blízkosti genu *Dn_{CI2401}* byly navrženy primery pro 52 potenciálních markerů, z toho 14 mikrosatelitových (SSR) markerů, 33 markery ISBP a 5 markerů IRAP. Všechny tyto markery byly testovány na polymorfismus mezi rodiči mapovací populace. Polymorfismus byl detekován pouze v případě jednoho mikrosatelitového markeru (*MSI*).

Summary

Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) is an important pest of bread wheat (*Triticum aestivum*). CI 2401 line carries on the short arm of chromosome 7D *Dn_{CI2401}* gene that underlies resistance to this aphid species in the form of antibiosis. This thesis is focused on genetic mapping in the *Dn_{CI2401}* region.

We compared detection methods suitable for high-throughput genotyping microsatellite markers employing a F_{2:3} mapping population derived from a cross of resistant line CI 2401 with susceptible cultivar Glupro. Separation by capillary electrophoresis, electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel and electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel and were confronted. The methods were compared using three markers linked to the *Dn_{CI2401}* gene whose alleles differ by only 2 bp in the applied mapping population. Electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel and capillary electrophoresis have proved to be suitable for high-throughput analysis of these microsatellite markers. These two methods provide comparable resolution. Electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel was evaluated as unsuitable for the above-mentioned purpose because of insufficient resolution of the gel and poor reproducibility of results.

Another aim of this work was deriving new markers for increasing density of genetic map around the gene of interest. The markers were derived from BAC clones of a DNA library specific for the short arm of 7D chromosome. Based on the knowledge of BAC-end sequences of seven BAC clones and the complete sequence of four BAC clones located near the *Dn_{CI2401}* gene, primers were designed for 52 potential markers, including 14 microsatellite (SSR) markers, 33 ISBP markers and 5 IRAP markers. All these markers were tested for polymorphism between parents of the mapping population. Polymorphism was detected only in case of one microsatellite marker (*MS 1*).

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle práce	9
3. Současný stav řešené problematiky	10
3.1 Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>)	10
3.2 Mšice zhoubná (<i>Diuraphis noxia</i>)	12
3.2.1 Charakteristika mšice zhoubné	12
3.2.2 Rezistence k mšici zhoubné u pšenice seté	13
3.2.2.1 Kategorie rezistence	13
3.2.3 Výskyt a přehled genů podmiňujících rezistenci k mšici zhoubné	14
3.3 Genetické mapování	17
3.3.1 Úvod ke genetickému mapování	17
3.3.2 Základní princip určení vzdáleností na genetické mapě	18
3.3.3 Mapovací populace	20
3.3.3.1 Mapovací populace vhodné pro samosprašné rostliny	20
3.3.3.2 Mapovací populace vhodné pro cizosprašné rostliny	23
3.3.4 Genetické markery	23
3.3.4.1 Markerové systémy vhodné pro mapování genomu pšenice	25
4. Materiál a metodika	31
4.1 Materiál	31
4.1.1 Biologický materiál	31
4.1.2 Přístrojové vybavení	31
4.1.3 Chemikálie	32
4.1.4 Komerční kity	33
4.1.5 Pufry, roztoky a média	33
4.1.5.1 Pufry	33
4.1.5.2 Roztoky	34
4.1.5.3 Média	35
4.2 Metodika	36
4.2.1 Izolace DNA	36
4.2.1.1 Vysokokapacitní izolace DNA	36
4.2.2 Metody pro analýzu genotypu za pomoci mikrosatelitových markerů	37
4.2.2.1 Analyzované markery	37
4.2.2.2 Amplifikace markerových lokusů pomocí PCR	37
4.2.2.3 Kapilární elektroforéza	38

4.2.2.4 Elektroforéza v nedenuřujícím polyakrylamidovém gelu	39
4.2.2.5 Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu	40
4.2.3 Odvozování markerů pro zahuštění genetické mapy v oblasti genu <i>Dn_{CI2401}</i>	41
4.2.3.1 Amplifikace markerových lokusů pomocí PCR.....	44
4.2.3.2 Separace produktů PCR na polyakrylamidovém gelu.....	45
4.2.3.3 Sekvenování ISBP lokusů	45
5. Výsledky	49
5.1 Metody pro analýzu genotypu za pomoci mikrosatelitových markerů	49
5.1.1 Kapilární elektroforéza	49
5.1.2 Elektroforéza v nedenuřujícím polyakrylamidovém gelu	52
5.1.3 Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu	54
5.2 Testování nových markerů	58
5.2.1 Mikrosatelitové (SSR) markery.....	58
5.2.2 Markery ISBP	60
5.2.3 Markery IRAP	63
6 Diskuze.....	64
6.1 Metody pro vysokokapacitní analýzu mikrosatelitových markerů.....	64
6.1.1 Kapilární elektroforéza	64
6.1.2 Elektroforéza v nedenuřujícím polyakrylamidovém gelu	64
6.1.3 Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu	65
6.1.4 Kvalita použité DNA	66
6.2 Odvozování markerů za účelem zahuštění genetické mapy v oblasti genu <i>Dn_{CI2401}</i> . 66	
7. Závěr	68
8 Seznam zkratk.....	69
9 Použitá literatura	71

1. Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) je ekonomicky významnou plodinou, která poskytuje potravu pro 35% obyvatelstva světa (<http://www.cimmyt.org/>). Je pěstována na 217 milionech hektarů (FAOstat, 2008) a v objemu produkce ji předčí jen rýže a kukuřice. Se vzrůstajícím počtem obyvatel je nutné zajistit i zvýšenou produkci této plodiny. Výnos může být snižován působením nejrůznějších škodlivých organismů. Jedním z významných škůdců pšenice seté je mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov). Tento škůdce působí nemalé ekonomické ztráty ve většině oblastí, kde se pšenice pěstuje. Chemické i biologické postupy hubení mšice zhoubné jsou neúčinné. Proto se jeví jako nejvýhodnější způsob ochrany pěstování odrůd nesoucích geny pro rezistenci vůči tomuto škůdci. Ty lze získat buď šlechtěním odrůd nesoucích geny pro rezistenci, nebo vnášením těchto genů do citlivých odrůd metodami genového inženýrství. V obou případech je třeba nalézt dostatečné množství markerů v těsné blízkosti genu pro rezistenci, což je předmětem genetického mapování. Tyto markery mohou být použity pro selekci za pomoci markerů (MAS, *marker assisted selection*), která výrazně urychluje proces šlechtění, a také při pozičním klonování genu pro rezistenci. Genetické mapování je v případě pšenice seté znesnadňováno značnou velikostí genomu (17 Gb; Bennett *et* Smith, 1991) a zejména přítomností tří homeologických subgenomů.

Genetickým mapováním v oblasti jednoho z genů pro rezistenci k mšici zhoubné, konkrétně genu *Dn_{CI2401}*, se zabývá předkládaná práce. Konstrukce vysokohustotní genetické mapy v oblasti tohoto genu by se měla stát základem pro jeho poziční klonování.

2. Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na zadané téma
- Porovnání detekčních metod vhodných pro analýzu genotypu mikrosatelitových markerů ve velkém měřítku
- Odvozování markerů za účelem zahuštění genetické mapy v oblasti genu *Dn_{CI2401}*

3. Současný stav řešené problematiky

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum*)

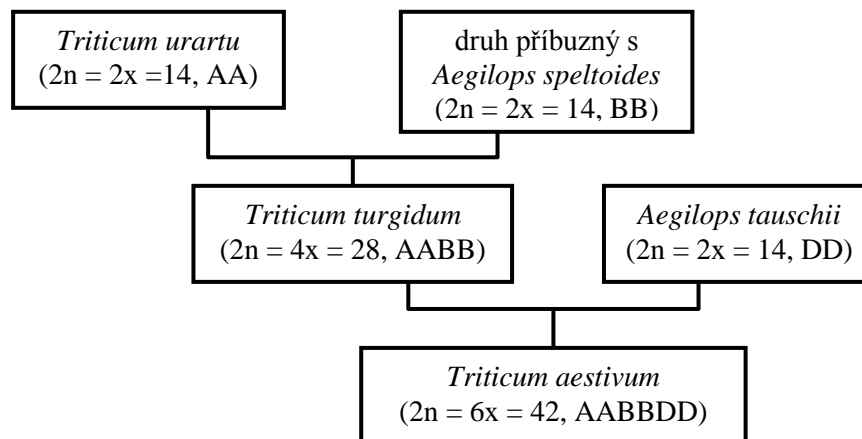
Pšenice setá (*Triticum aestivum*) je řazena do čeledi *Poaceae* a tribu *Triticeae*. Čeleď *Poaceae* zahrnuje více než 10 000 druhů a 651 rodů rostlin. Součástí tribu *Triticeae* jsou kromě rodu *Triticum* také rody *Aegilops* (mnohoštět), *Secale* (žito) a *Hordeum* (ječmen). Základní chromozómové číslo (x) v rámci těchto rodů je 7. Do tribu *Triticeae* náleží jak diploidní druhy (*Hordeum vulgare*, *Secale cereale*), tak tetraploidní druhy (*Triticum durum*), hexaploidní druhy (*T. aestivum*, *Triticale*) a rovněž některé oktaploidní druhy *Triticale*. Druhy v rámci tribu *Triticeae* jsou si blízcě příbuzné, tudíž je mezi nimi možné vytvářet fertilitní hybridy. V posledních 100 letech docházelo k intenzivnímu šlechtění druhů v rámci *Triticeae*, což vedlo ke značnému zvýšení výnosu a kvality těchto plodin (Feuillet *et al.*, 2008).

Rod *Triticum* zahrnuje diploidní, tetraploidní i hexaploidní druhy. *T. aestivum* je allohexaploidní druh, jehož genom je tvořen třemi subgenomy, značenými písmeny A, B a D. Diploidní počet chromozómů je 42 ($2n = 6x = 42$, AABBDD). Chromozómy 1 – 7 v jednotlivých diploidních subgenomech (A, B, D) jsou si evolučně velice příbuzné a jsou označovány jako homeologní. Homeologní chromozómy z jednotlivých subgenomů nejsou zcela identické, ale vykazují značnou podobnost. Proto se mohou tyto chromozómy do určité míry párovat, což umožňuje mezidruhové křížení a genové manipulace (Gustafson *et al.*, 2009).

Dnes pěstovaná hexaploidní pšenice je převážně samosprašným druhem, jehož diverzita je reprezentována v přírodě množstvím klonů. V současné době je pěstováno přibližně 25 000 různých odrůd (kultivarů) (Gustafson *et al.*, 2009). K evoluci druhu *T. aestivum* došlo na základě dvou po sobě následujících hybridizací (obr. 1), k nimž docházelo v oblasti tzv. Úrodného půlměsíce (Izrael, Jordánsko, Turecko, Sýrie, Írán, Irák) (Keller *et al.*, 2005, Feuillet *et al.*, 2008). V první fázi pravděpodobně došlo k hybridizaci mezi diploidním druhem *T. urartu* ($2n = 2x = 14$, AA) a dosud neznámým diploidním druhem ze sekce *Sitopsis*, který poskytl genom B a byl blízcě příbuzný s *Aegilops speltoides* (Feuillet *et al.*, 2008). Výsledkem této hybridizace, k níž došlo před 0,5 – 3 miliony let (Keller *et al.*, 2005), byl tetraploidní druh *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB), jenž byl domestikován před více než 10 000 let. Dnes je ekonomický význam *T. turgidum* poměrně malý, ve větší míře je pěstován pouze poddruh *T. turgidum* ssp. *durum* (pšenice tvrdá) za účelem produkce těstovin (Feuillet *et al.*, 2008). Před 8 000 let došlo

k hybridizaci *T. turgidum* s diploidním donorem genomu D, *Ae. tauschii* ($2n = 2x = 14$, DD). Výsledkem tohoto křížení byla hexaploidní pšenice *T. aestivum* s genomovou konstitucí AABBDD (Keller *et al.*, 2005). Diploidní genom *Ae. tauschii* vnesl do genomu hexaploidní pšenice geny umožňující lepší adaptaci pšenice na kontinentální klima, což umožnilo větší geografické rozšíření hexaploidního *T. aestivum* oproti tetraploidnímu *T. turgidum* (Feuillet *et al.*, 2008). Evoluce rodu *Triticum* je jedním z nejlepších modelů polyploidizace, častého způsobu evoluce u rostlin. Tato forma evoluce vedla ke vzniku úspěšného druhu, který je vysoce adaptabilní k širokému spektru podmínek prostředí. Mutace v jednotlivých genomech vedly ke zvýšení variability a samosprašný způsob rozmnožování pšenice umožnil akumulaci těchto mutací (Gustafson *et al.*, 2009).

Výzkum genomu pšenice je značně komplikovaný vzhledem k jeho složitosti a velikosti ($1C = 16\,974$ Mb; Bennett *et al.*, 1991). Každý samostatný chromozóm pšenice je větší než celý genom rýže. Velikosti jednotlivých chromozómů se pohybují v rozsahu 605 – 995 Mb (Doležel *et al.*, 2009). Genom pšenice je tvořen jedinečnými nebo nízkokopiovými sekvencemi obklopenými oblastmi s vysoce repetitivní DNA. Repetitivní DNA tvoří více než 80 % genomu pšenice (Smith *et al.*, 1975).



Obr. 1: Schéma hybridizačních událostí v průběhu vývoje genomu pšenice seté (*Triticum aestivum*)

3.2 Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*)

3.2.1 Charakteristika mšice zhoubné

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov) je řazena do řádu stejnokřídlí (*Homoptera*), čeledi mšicovití (*Aphididae*). Jedná se o významného škůdce pšenice (*T. aestivum*) a ječmene (*Hordeum vulgare*) (Ennahli *et al.*, 2009).

Zástupci čeledi mšicovití jsou celosvětově rozšířenými škůdci rostlin, jejichž výskyt je vázán na rozšíření hostitele. Mšice jsou považovány za agronomicky nejškodlivější hmyzí škůdce (Franzen *et al.*, 2008). Celkový počet druhů v rámci čeledi *Aphididae* se odhaduje na 3 000 (Krejča *et Korbel*, 2001). Jedná se o herbivorní hmyz s bodavě savým ústním ústrojím, jenž poškozují rostlinu sáním tekutin z rostlinných pletiv. Při přijímání potravy dochází k vylučování slin obsahujících enzymy, které vyvolávají poškození rostliny. Současně může při napadení rostliny docházet k přenosu virových a jiných chorob. Rozmnožovací schopnost tohoto hmyzu je obrovská. Přemnožení může vézt až ke smrti rostliny.

Původní výskyt mšice zhoubné (*Diuraphis noxia*) je v oblasti Afgánistánu, Iránu, jižního Ruska a v zemích okolo Středoziemního moře. Koncem 70. let 20. století se začal tento škůdce šířit přes Střední východ dále do Afriky, Evropy a Severní a Jižní Ameriky. V druhé polovině 80. let již způsobovala mšice zhoubná v těchto zemích nemalé ekonomické ztráty (Smith *et al.*, 2004a).

Napadení rostliny mšicí zhoubnou se projevuje výskytem bílých či žlutých podélných pruhů na listech a současným svinováním listů. V poškozených pletivech dochází ke snížení množství chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů, což vede ke snížené schopnosti využít světelnou energii, a k poklesu fotosyntézy (Franzen *et al.*, 2008). Nižší úroveň fotosyntézy je rovněž zapříčiněna svinováním listů, které zmenšuje plochu využitelnou pro fotosyntézu. Svinuté listy poskytují mšicím úkryt a vhodné místo k rozmnožování. Takto ukryté mšice jsou chráněny před účinky pesticidů a biologických agens (např. entomopatogenní houby) používaných k jejich eliminaci (Gutsche *et al.*, 2009, Ennahli *et al.*, 2009). Jelikož jsou chemické i biologické způsoby hubení škodlivého hmyzu v případě mšice zhoubné neúčinné, jeví se jako účinný, ekonomický a bezpečný pro životní prostředí vývoj nových odrůd nesoucích geny rezistence k tomuto škodlivému organismu (Liu *et al.*, 2002, Gutsche *et al.*, 2009). Další překážkou v boji s tímto organismem je jeho schopnost vyvíjet nové virulentní biotypy (Ennahli *et al.*, 2009).

3.2.2 Rezistence k mšici zhoubné u pšenice seté

3.2.2.1 Kategorie rezistence

Rezistence je schopnost hostitele potlačit nebo oddálit aktivitu škodlivého (patogenního) organismu. Jedná se tedy o schopnost hostitelského organismu odolat nebo klást odpor patogennímu agens, případně zmenšit nebo překonat účinky jeho působení. (Kůdela *et al.*, 1989). Rezistence je souborem dědičných vlastností rostliny vedoucích k menšímu poškození při napadení škůdcem v porovnání s citlivou rostlinou (Smith, 2005). Organismus označovaný jako citlivý (náchylný) není schopný se invazi škodlivého organismu bránit a překonat její následky (Kůdela *et al.*, 1989).

U rostlin se vyskytují tři kategorie rezistence vůči mšicím – antixenóza, antibióza a tolerance (Smith, 2005).

Antixenóza (non-preference) je souborem morfologických a chemických faktorů, které u škodlivého organismu vyvolají změnu výběru hostitelské rostliny. Škůdce rezistentní rostlinu nepreferuje a jako hostitele si vybírá rostlinu jinou. Antixenóza je založena na tvorbě fyzikálních bariér (zesílené vrstvy pokožky, zvýšená hustota trichomů) a produkci chemických látek. Chemické látky škůdce odrazují od konzumace či kladení vajíček, některé z těchto látek mohou být pro jeho organismus toxické (Smith, 2005).

Antibióza zahrnuje morfologické i chemické faktory, jež působí negativně na biologické funkce škodlivého organismu. Účinky antibiózy mohou být mírné až letální. Působení antibiózy se projevuje akutně (působení na vajíčka a nižší vývojová stádia), nebo chronicky (vede k mortalitě v pozdějších fázích vývoje). Jedinci, kteří jsou schopni účinky antibiózy přežít, nesou různá vývojová poškození, často nedospívají a mají sníženou plodnost (Smith, 2005).

Tolerance je schopnost rostliny odolat a zotavit se po napadení škodlivým organismem. Jedná se o vlastnosti rostliny, které umožňují přežití a zároveň nový vývoj infikovaných částí po jejich zničení a odstranění. Rostliny, jež jsou tolerantní k napadení škůdcem, obvykle nevyžadují antixenotickou a antibiotickou rezistenci. Z hlediska působení na evoluci škodlivého organismu je tolerance pro pěstitele nejlepším typem rezistence. V případě tolerance nehraje roli interakce škůdce-hostitel (jako je tomu u antixenózy a antibiózy), rostlina na škodlivý organismus nepůsobí negativně a nedochází tak k selekčnímu tlaku, jenž by vedl k vývoji nových virulentních biotypů (Smith, 2005).

3.2.3 Výskyt a přehled genů podmiňujících rezistenci k mšici zhoubné

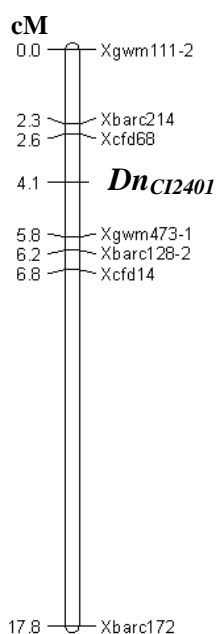
Rezistence k mšici zhoubné u pšenice je podmíněna několika různými geny. Tyto geny mohou podmiňovat všechny tři typy rezistence - antixenózu, antibiózu i toleranci. Blíže je charakterizováno minimálně 11 různých genů rezistence pocházejících z pšenice, žita a *Aegilops tauschii*. Prvních 11 genů je značeno pořadovým číslem či písmenem (*Dn1 – Dn9, Dnx, Dny*). Kromě těchto genů, které jsou uvedeny v tabulce 1, existuje řada dalších genů pro rezistenci, které jsou značeny názvem linie, ze které daný gen pochází. Příkladem jsou geny *Dn_{CI2401}* (Voothuluru *et al.*, 2006) a *Dn₂₄₁₄* (Peng *et al.*, 2007). Všechny geny uvedené v tabulce jsou geny dominantní s výjimkou recesivního genu *dn3*, který pochází z *Aegilops tauschii*. Dále byly zamapovány QTL pro rezistenci podmiňující antixenózu a antibiózu (Castro *et al.*, 2004).

Tab. 1: Přehled genů pro rezistenci k mšici zhoubné

Gen	Zdroj (linie pšenice)	Lokalizace v genomu	Původní výskyt genu	Reference
<i>Dn1</i>	PI 137739	7DS blízko centromery	pšenice	Du Toit, 1987
<i>Dn2</i>	PI 262660	7DS blízko centromery	pšenice	Du Toit, 1987
<i>dn3</i>	CO 03810	-	<i>Aegilops tauschii</i> SQ24	Nkongolo <i>et al.</i> , 1991
<i>Dn4</i>	PI 372129	1DS	pšenice	Nkongolo <i>et al.</i> , 1991, Liu <i>et al.</i> , 2002
<i>Dn5</i>	PI 294994	7DS blízko centromery	pšenice	Du Toit, 1987, Marais <i>et Du Toit</i> 1993
<i>Dn6</i>	PI 243781 CI 6501	7DS blízko centromery	pšenice	Nkongolo <i>et al.</i> , 1991, Saidi <i>et Quick</i> 1996
<i>Dn7</i>	94M370	translokace 1RS.1BL	žito	Marais <i>et al.</i> , 1994, 1998
<i>Dn8</i>	PI 294994	7DS blízko telomery	pšenice	Liu <i>et al.</i> , 2001
<i>Dn9</i>	PI 294994	1DL	pšenice	Liu <i>et al.</i> , 2001
<i>Dnx</i>	PI 220127	7DS blízko centromery	pšenice	Harvey <i>et Martin</i> 1990
<i>Dny</i>	PI 220350	-	pšenice	Martin <i>et al.</i> , 2001

Populace mšice vykazují nemalou biotypovou variabilitu. Celosvětově bylo identifikováno nejméně 8 biotypů mšice zhoubné (Puterka *et al.*, 1992). Virulence jednotlivých biotypů z různých lokalit v rámci celého světa k odrůdám nesoucím geny pro rezistenci je velmi variabilní. Například populace mšic ze Střední Evropy, Ruska, Sýrie a Etiopie jsou virulentní k rostlinám nesoucím gen *Dn4* (Smith *et al.*, 2004b). Populace mšic z Maďarska jsou virulentní ke genům *Dn1*, *Dn2*, *Dn4* a *Dn5* (Basky, 2002), etiopské populace jsou virulentní ke genu *Dny* a populace z Čile pak ke genu *Dn4*.

V USA byl původně identifikován pouze jediný biotyp mšice, označovaný jako biotyp 1. K tomuto biotypu byly rezistentní odrůdy nesoucí gen *Dn4*, který byl vnášen do genomu hostitelských rostlin právě za účelem ochrany pšenice proti mšici zhoubné. Později se však ukázalo, že populace mšic z některých států USA se stávají virulentní vůči tomuto genu a dalším genům rezistence *Dn1*, *Dn2*, *Dn5*, *Dn6* a *Dny* (Randolph *et al.*, 2003). V roce 2003 byl identifikován nový biotyp - biotyp 2. Jedná se o první změnu ve virulenci mšice zhoubné v USA (Peng *et al.*, 2009). V současnosti již byla prolomena rezistence podmíněná všemi geny uvedenými v tabulce 1 s výjimkou genu *Dn7*. Z tohoto důvodu bylo třeba identifikovat nové zdroje rezistence. Ty je možno najít zejména v liniích a starých krajových odrůdách (landrasách) pocházejících ze Střední Asie (Peng *et al.*, 2009). Příkladem je linie pšenice CI 2401, která vykazuje rezistenci vůči biotypu 2, která je založena na antibióze. Tato linie nese dva dominantní geny, z nichž jeden je shodný s genem *Dn4*, zajišťujícím rezistenci k biotypu 1 (Dong *et al.*, 1997). Druhý gen podmiňuje rezistenci k biotypu 2. Tento gen je lokalizován na krátkém rameni chromozómu 7D (7DS) a nese označení *Dn_{CI2401}*. Peng *et al.* (nepublikováno) konstruovali genetickou mapu okolí tohoto genu, která je tvořena sedmi mikrosatelitovými markery v rozsahu 17,8 cM (obr. 2).



Obr. 2: Genetická mapa okolí genu *Dn_{CI2401}*

Rezistence k biotypu 2 byla nalezena u celé řady dalších linií a odrůd. V tabulce 2 jsou uvedeny dosud identifikované rezistentní linie pšenice.

Tab. 2: Přehled linií nesoucích rezistenci k mšici zhoubné biotypu 2

	Název odrůdy	Země původu		Název odrůdy	Země původu
1	CI 2401	Tádžikistán	28	PI 621392	Írán
2	CI 11349	Bulharsko	29	PI 621394	Írán
3	PI 134134	Afghánistán	30	PI 621421	Írán
4	PI 135064	Afghánistán	31	PI 621458	Írán
5	PI 140213	Írán	32	PI 621460	Írán
6	PI 220131	Afghánistán	33	PI 621462	Írán
7	PI 221482	Afghánistán	34	PI 621721	Írán
8	PI 243659	Írán	35	PI 621736	Írán
9	PI 245583	Afghánistán	36	PI 621837	Írán
10	PI 283886	Afghánistán	37	PI 622843	Írán
11	PI 347006	Afghánistán	38	PI 622009	Írán
12	PI 352008	Kazachstán	39	PI 622083	Írán
13	PI 366103	Egypt	40	PI 622205	Írán
14	PI 366518	Afghánistán	41	PI 622219	Írán
15	PI 366572	Afghánistán	42	PI 622278	Írán
16	PI 366589	Afghánistán	43	PI 622769	Írán
17	PI 572652	Kazachstán	44	PI 622825	Írán
18	PI 620913	Írán	45	PI 622826	Írán
19	PI 620951	Írán	46	PI 622831	Írán
20	PI 620991	Írán	47	PI 622855	Írán
21	PI 621019	Írán	48	PI 623081	Írán
22	PI 621097	Írán	49	PI 623611	Írán
23	PI 621117	Írán	50	PI 623825	Írán
24	PI 621123	Írán	51	PI 623836	Írán
25	PI 621154	Írán	52	PI 624151	Írán
26	PI 621256	Írán	53	PI 624152	Írán
27	PI 621362	Írán			

Upraveno podle Peng *et al.* (2009).

Identifikace odrůd a linií nesoucích rezistenci k mšici zhoubné je nezbytná pro vytvoření ochrany před tímto škůdcem. Jednou z možností ochrany je vnášení identifikovaných genů pro rezistenci do pěstovaných odrůd. To lze provádět jak metodami genového inženýrství, tak klasickými šlechtitelskými postupy. V obou případech je potřeba nalézt markery v co nejtěsnější blízkosti studovaného genu, což je předmětem genetického mapování. Nalezené markery mohou být použity jak pro poziční klonování příslušného genu, tak v rámci šlechtění pro selekci za pomoci markeru (MAS, *marker assisted selection*).

3.3 Genetické mapování

3.3.1 Úvod ke genetickému mapování

Genetické mapy spolu s mapami fyzickými poskytují podklady pro poziční klonování genů, případně sekvenování genomu. Genetická mapa představuje relativní pořadí lokusů (genetických značek – markerů) na chromozómu. Toto pořadí je zjištěno na základě frekvence rekombinace mezi studovanými lokusy.

Rekombinace je jev vyskytující se v průběhu meiotického dělení, které vede ke vzniku gamet. V profázi meiózy dochází k párování homologních chromozómů a k fyzické výměně genetického materiálu v důsledku procesu nazývaného crossing-over. V případě, že jsou všechny lokusy homozygotní, se gamety genotypově neliší od rodičovských chromozómů. Pokud ovšem dochází k rekombinaci chromozómů nesoucích geny v heterozygotním stavu, jsou výsledkem rekombinace kromě chromozómů, které se shodují s rodičovskými, také chromozómy s novými kombinacemi alel genů. Geny nacházející se na jednom chromozómu jsou ve vazbě. Síla vazby mezi jednotlivými lokusy závisí na jejich vzájemné vzdálenosti, ale také na struktuře chromozómu. Rekombinace je omezená v oblasti centromery a telomer a rovněž v blízkosti heterochromatinových oblastí (jev nazývaný pozitivní interference).

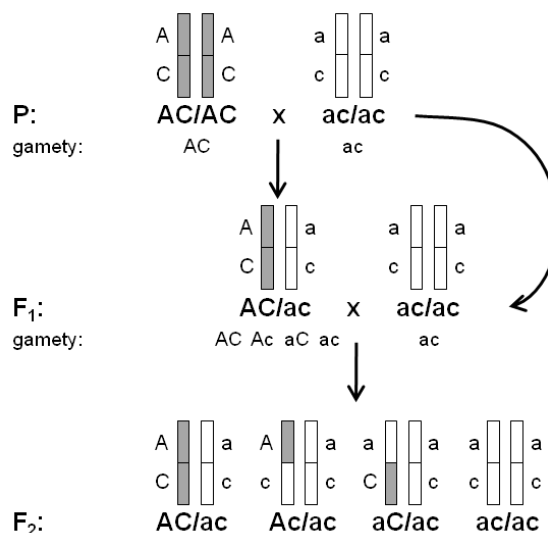
Lokusy, které jsou blízko sebe, podléhají rekombinaci s menší pravděpodobností než lokusy vzdálené. Množství crossing-overů je tedy funkcí vzdálenosti daných lokusů. Pravděpodobnost každého crossing-overu, ke kterému dojde během jedné meiózy, udává frekvenci rekombinace (r). Frekvence rekombinace je pak základem pro určení genetických vzdáleností mezi lokusy. Hodnota frekvence rekombinace je převáděna na mapové jednotky centiMorgany (cM). Vzdálenost uváděná v centimorganech numericky odpovídá frekvenci rekombinace vyjádřené v procentech. Jeden cM je genetická vzdálenost mezi dvěma lokusy s frekvencí rekombinace, která činí 1%. Relativní vzdálenost definovaná jako 1 cM odpovídá různým fyzickým vzdálenostem v řádech tisíců až miliónů párů bází, v závislosti na organismu, a také na oblasti chromozómu, ve které se studované lokusy nacházejí, případně zda působí pozitivní interference (Mihovilovic *et al.*, 2008).

3.3.2 Základní princip určení vzdáleností na genetické mapě

Vzdálenosti mezi jednotlivými lokusy jsou určovány z frekvence rekombinací mezi nimi. Pro stanovení vzdálenosti dvou lokusů je využíván dvoubodový test. Pořadí tří lokusů a jejich vzdálenost jsou stanoveny třibodovým testem.

Dvoubodový test

Pro stanovení vzdálenosti dvou lokusů (*A* a *C*) je provedeno testovací křížení (obr. 3). Jsou kříženi dva jedinci lišící se fenotypově ve dvou studovaných znacích (dihybridní křížení). Heterozygotní jedinci F_1 generace jsou poté kříženi s rodičem, který je pro dané znaky recesivním homozygotem. V případě volné kombinovatelnosti vloh by se ve vzniklém potomstvu (F_2) měly vyskytovat možné genotypy v poměru 1:1:1:1. Pokud je ale mezi studovanými geny vazba, budou se některé kombinace genotypů vyskytovat častěji a jiné méně často v závislosti na síle vazby.



Obr. 3: Postup testovacího křížení

Genotypy, které se budou v F_2 generaci vyskytovat ve větším počtu budou odpovídat rodičovským genotypům. V tomto případě mezi lokusy nedošlo k rekombinaci. Genotypy, které jsou zastoupeny v menšině, odpovídají rekombinantním genotypům. Pokud vypočítáme podíl jedinců s rekombinantním genotypem, ku celkovému počtu jedinců, zjistíme frekvenci, se kterou mezi danými lokusy dochází k rekombinaci.

$$r = (\text{počet rekombinantních genotypů} / \text{celkový počet genotypů}) * 100$$

Výsledkem je procentuální zastoupení rekombinantních genotypů, které odpovídá vzdálenosti studovaných lokusů na genetické mapě, vyjádřené v centimorganech (Mihovilovic *et al.*, 2008).

Tříbodový test

Tříbodový test umožňuje zjistit pořadí a současně vzdálenost tří různých lokusů, které jsou ve vazbě (lokusy *A*, *B*, *C*). Testovací křížení je prováděno stejným způsobem jako v případě dvoubodového testu, s tím rozdílem, že v F_2 generaci je přítomno 8 genotypových štěpných tříd. V případě studia tří lokusů je třeba uvážit možnost výskytu dvojitého crossing-overu. Stejně jako u dvoubodového testu jsou nejčastěji zastoupeny rodičovské genotypy. Jedinci, kteří vznikli z gamet, u nichž došlo k dvojitému crossing-overu, jsou zastoupeni v nejmenším počtu. Pro zjištění vzdálenosti mezi lokusy *A* a *C* je nejprve vypočítána vzdálenost mezi lokusy *A* a *B* a poté mezi lokusy *B* a *C*. Zjištěné hodnoty jsou sečteny. Vzdálenost mezi lokusy *A* a *C* vypočítaná tříbodovým testem je vyšší ve srovnání s hodnotou získanou dvoubodovým testem, protože je zvažována možnost výskytu dvojitého crossing-overu mezi lokusy *A* a *C*. Dvojitý crossing-over není v případě dvoubodového testu detekovatelný (Mihovilovic *et al.*, 2008).

Při způsobu, jakým je genetická vzdálenost počítána, není možné při výpočtu vzdálenosti dvou lokusů určit větší vzdálenost než 50 cM. Pokud jsou dva geny od sebe dále, nelze zjistit, zda jsou na jednom chromozómu nebo na dvou různých chromozómech, pokud není využito jiného způsobu detekce. Lineární vztah mezi frekvencí rekombinace a genetickou vzdáleností dvou lokusů platí pouze v rámci vzdálenost $< \sim 7$ cM. Pokud je vzdálenost vyšší než tato hodnota a není znám žádný další lokus mezi studovanými dvěma lokusy, není možné zaručit, zda mezi nimi nedošlo k dvojitým nebo vícenásobným crossing-overům. Získané hodnoty proto mohou být zkreslené. Pro větší vzdálenosti než 7 cM je třeba použít statistickou úpravu. K úpravě odchylky od lineárního vztahu jsou používány dva typy mapovacích funkcí – Haldaneova a Kosambiho funkce (Haldane, 1919; Kosambi 1944).

Pro tvorbu genetické mapy je zapotřebí získat data z velkého počtu jedinců. Za tímto účelem jsou vytvářeny mapovací populace jako základní nástroje pro konstrukci genetických map. Velká množství dat získaná analýzou jedinců z mapovacích populací jsou rutinně zpracovávána počítačovými programy. Mezi nejčastěji používané patří např.

program MAPMAKER v3.0 (Lander *et al.*, 1987) nebo JoinMap (Stam, 1993), existuje však řada dalších programů.

3.3.3 Mapovací populace

Mapovací populace jsou nástrojem pro určení rekombinační vzdálenosti mezi studovanými lokusy a tedy nástrojem nezbytným ke konstrukci genetických map. Mapovací populace vznikají kontrolovaným křížením jedinců jednoho druhu případně křížením mezi příbuznými druhy. Křížení jedinci se liší ve znaku, který je předmětem studia, ale také by se měli lišit v sestavě genetických markerů, které jsou vybrány pro tvorbu mapy. Výběr rodičů, kteří tvoří základ mapovací populace, je kritickým faktorem při plánování experimentu. Obecně platí, že vysoká genetická diverzita mezi rodiči usnadňuje umístování markerů na genetickou mapu. Pro konstrukci genetické mapy s malým rozlišením je dostačující populace o velikosti 100 jedinců, aby však bylo dosaženo dostatečného rozlišení nezbytného pro poziční klonování genu, je vyžadován počet jedinců v řádech tisíců (Alpert *et Tanksley*, 1996).

Výběr mapovací populace se liší v závislosti na způsobu rozmnožování rostlin. Pro samosprašné rostliny jsou vhodné F_2 populace, populace zpětných kříženců (BC), rekombinantní inbrední linie (RILs), a dihaploidní linie (DHL), případně další typy populací, z daných populací odvozené. Pro cizosprašné druhy, případně druhy trpící inbrední depresí jsou k mapování využívány F_1 populace a populace zpětných kříženců (BC, Schneider, 2005).

3.3.3.1 Mapovací populace vhodné pro samosprašné rostliny

Pro tvorbu těchto populací jsou vybírány homozygotní rodičovské linie rostlin. Tyto linie, pokud vznikají opakovaným samosprašením, mohou obsahovat určitou zbytkovou heterozygotnost. Tomuto problému je možné se vyhnout použitím dihaploidních linií bez jakékoliv zbytkové heterozygotnosti. Níže jsou popsány jednotlivé typy populací využívané pro genetické mapování u samosprašných rostlin, včetně jejich výhod a nevýhod, případně příkladů použití.

F₂ populace

Populace jedinců F_2 generace představují nejjednodušší formu mapovací populace. V první fázi jsou kříženi dva homozygotní rodiče (čisté linie) lišící se ve studovaném znaku. Jedinci vzniklé F_1 generace jsou všichni heterozygotní. U těchto jedinců dojde k samosprášení. Následně vzniklé rostliny představují mapovací populaci F_2 . F_2 populace je výsledkem jedné meiózy, při které dochází k rekombinaci při tvorbě gamet F_1 generace. Jedinci F_2 generace se vzájemně liší svou genetickou konstitucí.

Jedná se o mapovací populaci nenáročnou na výrobu, která je vytvořena během dvou generací. Nevýhodou je omezená doba životnosti, pokud nedochází k asexuálnímu rozmnožování F_2 jedinců. Tato populace je tedy limitována délkou života rostlin a není proto vhodná k opakovaným experimentům (Schneider, 2005; Hittalmani *et al.*, 2008).

F_{2:3} populace

$F_{2:3}$ populace představuje populaci rodin F_3 generace odvozenou z generace F_2 . Tato populace je vytvořena samosprášením jedinců F_2 generace. Každý F_2 jedinec může poskytnout velkou F_3 rodinu v závislosti na počtu vyprodukovaných semen. Jedinci v rámci každé rodiny F_3 generace nejsou homogenní, v důsledku rekombinace vzniká celá řada kombinací genotypů. Analýzou genotypů jednotlivých jedinců dané rodiny je ale možné určit původní genotyp jejich rodiče z generace F_2 . Při zjišťování genotypu F_2 rostlin je buď vybrán určitý počet jedinců z každé rodiny F_3 generace a je analyzován jejich genotyp nebo jsou vytvořeny pooly z DNA těchto vybraných jedinců. Ke zjištění genotypu F_2 jedince je obvykle použito 8 – 12 rostlin z každé rodiny. Při tvorbě poolů DNA je třeba dbát na to, aby podíl množství DNA z každé rostliny byl zcela stejný. Pokud by tomu tak nebylo, mohlo by docházet ke zkreslení výsledků analýzy (Hittalmani *et al.*, 2008).

Populace zpětných kříženců (BC, backcross population)

Populace zpětných kříženců jsou používány ke studiu určitého znaku nacházejícího se u jednoho z rodičů (donor) na pozadí genotypu druhého rodiče (recipient). Za tímto účelem je v první řadě vytvořena F_1 populace křížením dvou homozygotních rodičovských linií. Heterozygotní jedinci F_1 generace jsou poté kříženi s rodičem, jenž je označován jako recipient, případně rekurentní rodič. Úseky DNA donorové rostliny, které nejsou ve vazbě se studovaným lokusem, jsou odděleny segregací a délka úseků DNA, které jsou ve vazbě, je minimalizována díky rekombinaci s DNA recipienta. Ke snížení velikosti úseku DNA

donora bývá zpětné křížení několikrát opakováno, každé zpětné křížení sníží velikost úseku o 50%. V průběhu křížení je třeba pomocí molekulárních markerů, které jsou ve vazbě se studovaným znakem, sledovat zda je znak stále přítomen.

Pokročilým zpětným křížením vznikají téměř izogenní linie (NILs, *nearly isogenic lines*). Jedná se o rostliny, které z genomu donora obsahují minimální úsek DNA odpovídající jednomu nebo několika málo lokusům. K zafixování segmentu donora se provádí dvě kola samosprášení. Linie, které obsahují segment DNA z velmi vzdáleného druhu, jsou označovány jako introgresní linie. Sběrka takovýchto linií lišících se vloženými úseky DNA se nazývá exotická knihovna. Vložené úseky DNA jsou charakterizovány molekulárními markery. (Schneider, 2005; Hittalmani *et al.*, 2008)

Dihaploidní linie (DHL, double haploid lines)

Dihaploidní linie jsou využívány k vytvoření zcela homozygotních linií, u kterých není přítomna žádná zbytková heterozygotnost. Takto vytvořené rostliny mohou být poté použity jako homozygotní rodičovské linie pro tvorbu jiných typů mapovacích populací. K produkci dihaploidních linií dochází z haploidních rostlin. Ty se vyskytují buď přirozeně (řepka, kukuřice), nebo je haploidního stavu dosaženo kultivací nezralých prašníků či mikrospor na speciálním médiu. Ke zdvojení počtu chromozómů dochází u některých druhů spontánně, případně je zdvojení indukováno působením kolchicinu. Vlivem tohoto mitotického jedu dochází k zabránění tvorby mitotického vřeténka, a proto nedojde k rozdělení chromozómů do dvou dceřiných buněk. Dihaploidní populace představují nesmrtnou mapovací populaci, kterou je možné zachovat do budoucna bez jakýchkoliv genetických změn. Z tohoto důvodu jsou vhodné k opakovaným experimentům a tedy i ke studiu kvantitativních znaků. Tyto populace jsou dostupné pro řadu rostlin – např. pro kukuřici (Murigneux *et al.*, 2004), ječmen (Devaux *et al.*, 1995), bavlník (Zhang *et al.*, 2002) a další. Nevýhodou této populace je poměrně nákladný a náročný vývoj vzhledem k tomu, že získávání haploidních jedinců z mikrospor, případně vajíček je pracné a úspěšnost je závislá na použitém genotypu (Hittalmani *et al.*, 2008).

Rekombinantní inbrední linie (RILs, recombinant inbred lines)

Rekombinantní inbrední linie jsou homozygotními potomky jedinců F₂ generace. K jejich vzniku dochází opakovaným samosprášením rostlin po 7 až 10 generací. Rostliny této populace jsou rovněž nazývány *single-seed descent lines* – jedno semeno každé linie je základem další generace. Vzhledem k tomu, že dochází k několika samosprášením,

prochází genom postupně několika meiózami. Tím je zaručena větší přesnost mapování než např. v případě populace F_2 jedinců, u kterých došlo pouze k jedné meióze. Vzhledem k tomu, že výsledné rostliny jsou homozygotní, je možné je nadále množit beze změn genetické informace. Stávají se tak stálým zdrojem genetického materiálu stejně jako dihaploidní linie. Jejich vývoj je podstatně delší než v případě dihaploidních linií, ale zároveň je mnohem méně finančně i technicky náročný. Rekombinantní inbrední linie jsou dostupné např. pro rýži (Wang *et al.*, 1994), oves (O'Donoghue *et al.*, 1995) či *Arabidopsis* (Lister *et Dean*, 1993).

3.3.3.2 Mapovací populace vhodné pro cizosprašné rostliny

Genetické mapování u cizosprašných druhů či druhů trpících inbrední depresí je podstatně složitější než u samosprašných rostlin. Protože není možné získat zcela homozygotní rodiče, jsou základem populací rodiče heterozygotní. Při genetickém mapování cizosprašných rostlin je používána F_1 populace. V tomto případě je zjišťován genotyp jedinců F_1 generace. Případně mohou být jedinci F_1 generace zpětně kříženi s jedním z rodičů. Pak vzniká populace zpětných kříženců (BC).

3.3.4 Genetické markery

Genetické markery jsou určité dědičné znaky umožňující detekovat rozdíl v sekvenci DNA mezi dvěma jedinci. Tento rozdíl může být detekován na úrovni fenotypové, proteinové nebo na úrovni DNA v závislosti na použití markerového systému. Markery jsou podle toho děleny na morfologické (variace na fenotypové úrovni), biochemické (variace na úrovni proteinového produktu) a DNA markery (variace na úrovni DNA).

Vůbec první genetické mapování bylo provedeno s využitím morfologických (fenotypových) markerů jako je např. velikost či barva orgánu nebo velikost organismu. Z hlediska hodnocení se jedná o nejjednodušší a také nejlevnější systém. Nevýhodou však je, že celá řada znaků se vyskytuje jen v určitých fázích vývoje, což může podstatně prodlužovat dobu analýzy. Genetické mapy sestavené s pomocí těchto markerů byly vytvořeny např. pro kukuřici, hrách či rajče (Doveri *et al.*, 2008, Cole *et Abbott*, 2008).

Prvními markery studujícími variaci mezi jedinci na molekulární úrovni byly biochemické markery – izoenzymy. Jedná se o izoformy proteinů, které se liší velikostí, složením aminokyselin a nábojem (Markert *et Moller*, 1959). Je tedy možné je

elektroforeticky separovat na škrobových nebo polyakrylamidových gelech na základě velikosti a náboje. Nedostatkem těchto markerů je poměrně nízká míra polymorfismu a nedostatečné pokrytí genomu. Analyzované proteinové produkty mohou být rovněž tkáňově specifické, či mohou být ovlivněny fází vývoje organismu nebo podmínkami prostředí (Cole *et al.*, 2008).

Nejnovějšími a dnes nejpoužívanějšími jsou DNA markery. Tyto markery vykazují variaci na úrovni sekvence DNA. Používání DNA markerů je založeno na přirozeně se vyskytujících polymorfismech mezi jednotlivými genomy. Historicky prvními DNA markery byly RFLP markery (*restriction fragment length polymorphism*; Botstein *et al.*, 1980). Principem této metody je hybridizace specifické značené sondy na genomickou DNA různých jedinců štěpenou restrikčním enzymem. Objevení PCR dalo vzniknout celé řadě dalších markerových systémů, např. RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*; Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1990) či AFLP (*amplified fragment length polymorphism*; Vos *et al.*, 1995). V dnešní době je dostupná celá řada markerových systémů fungujících na principu PCR, hybridizace nebo kombinace těchto dvou metod. Přehled základních typů markerů je uveden v tabulce 3.

Tab. 3: Přehled základních markerových systémů

Marker	Princip	Reprodukovatelnost	Znalost sekvence	Zpracování
RFLP	hybridizace	vysoká	ne	elektroforéza, Southern blotting, hybridizace
RAPD	PCR	nízká	ne	agarózová nebo polyakrylamidová elektroforéza
CAPS	PCR	vysoká	ano	agarózová nebo polyakrylamidová elektroforéza
SCAR	PCR	vysoká	ano	agarózová nebo polyakrylamidová elektroforéza
AFLP	PCR	střední	ne	polyakrylamidová elektroforéza
SSR	PCR	vysoká	ano	polyakrylamidová elektroforéza
ISSR	PCR	vysoká	ne	agarózová nebo polyakrylamidová elektroforéza
IRAP	PCR	střední	ano	agarózová nebo polyakrylamidová elektroforéza
REMAP	PCR	střední	ano	agarózová elektroforéza s vysokým rozlišením nebo polyakrylamidová elektroforéza
ISBP/RJM	PCR	vysoká	ano	agarózová elektroforéza
SNP	PCR	vysoká	ano	sekvenování, analýza křivek teploty tání (melting analýza), SSCP a další

Upraveno podle Doveri *et al.*, 2008

Výběr vhodného markerového systému závisí na aplikaci, struktuře genomu studovaného organismu a dostupném laboratorním vybavení. Ideální markerový systém by měl být dostatečně citlivý, jednoduchý na užívání a dostatečně reprodukovatelný. Použité

markery by měly být rovnoměrně a čteně zastoupeny v genomu a měly by vykazovat vysokou míru polymorfismu.

3.3.4.1 Markerové systémy vhodné pro mapování genomu pšenice

Genetické mapování u pšenice je komplikováno velikostí genomu (17 Gb) a dále přítomností tří homeologických subgenomů. Molekulární markery začaly být pro studium genomu pšenice využívány před necelými 20 lety. První genetická mapa byla vytvořena s využitím RFLP markerů. Takto byly vytvořeny mapy pro všech 21 chromozómů pšenice. Později se analýza genomu pšenice začala rozvíjet především díky používání mikrosatelitových (SSR) markerů (Ganal *et* Roder., 2007). Dnes je pšeničný genom jedním z nejhustěji mapovaných genomů, pro který není známa kompletní sekvence (Paux *et al.*, 2006).

Mikrosatelity (SSR, simple sequence repeat)

Mikrosatelity, označované také SSR (*simple sequence repeat*), jsou markery založené na PCR. Jedná se o krátké tandemové repetice tvořené opakujícími se jednotkami (motivy) o délce 1 – 6 bp. Nejčastěji se vyskytují mikrosatelity s jednotkami o délce 2 nebo 3 nukleotidy. Počet opakujících se jednotek obvykle není vyšší než 70 (Doveri *et al.*, 2008). Mikrosatelity vykazují vysoký stupeň délkového polymorfismu, které je dán rozdílným počtem opakování repetitivního motivu. Tento polymorfismus vzniká sklouznutím DNA polymerázy (*DNA slippage*) v průběhu replikace (Levinson *et* Gutman, 1987). Mikrosatelity jsou kodominantní markery vykazující mendelistickou dědičnost. Vysoká úroveň polymorfismu a současně rovnoměrné a hojné zastoupení v genomu je předurčují pro využití ke genetickému mapování. Dále jsou mikrosatelity využívány pro DNA fingerprinting, MAS, studium genetiky populací či genetické diverzity (Nguyen *et* Wu, 2005).

Úsek DNA obsahující mikrosatelitovou sekvenci je amplifikován pomocí PCR s použitím unikátních primerů, jenž definují daný mikrosatelitový lokus. V průběhu PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů dochází ke vzniku artefaktů (minoritních produktů) lišících se od hlavního produktu a mezi sebou navzájem délkou 2 bp. Na elektroforetickém gelu je možné tyto produkty identifikovat jako slabší proužky, které jsou asociovány s hlavním produktem. Tyto proužky jsou označovány jako *stutter bandy*. *Stutter bandy* vznikají sklouznutím DNA polymerázy během PCR amplifikace. K jejich vzniku jsou

náchylné zejména mikrosatelity s dinukleotidovými repeticemi. Přítomnost *stutter bandů* může u mikrosatelitů s dinukleotidovými repeticemi znesnadňovat určení genotypu jedince pro daný marker. Jejich přítomnost je možné částečně eliminovat optimalizací podmínek PCR (Lareu *et al.*, 1998; This *et al.*, 2004; Doveri *et al.*, 2008).

Polymorfismus mezi mikrosatelitovými lokusy je detekován různými technikami v závislosti na značení primerů, použitém separačním systému a vizualizaci amplifikovaných produktů PCR. PCR může být provedena s neznačenými či značenými primery (radioaktivně, fluorescenčně). Následná separace produktů PCR je prováděna elektroforeticky na agarózových gelech, polyakrylamidových gelech či za pomoci kapilární elektroforézy na sekvenátoru. Na agarózovém gelu o hustotě vyšší než 3% je možno dosáhnout rozlišení okolo 10 bp, amplifikované produkty PCR jsou barveny roztokem ethidium bromidu. Pro vyšší rozlišení je nutné použít gely polyakrylamidové (PAA). Za denaturujících podmínek je na sekvenačních PAA gelech možné rozlišit i jednonukleotidový rozdíl mezi dvěma alelami mikrosatelitového lokusu (Schlötterer, 1998). Stejného rozlišení lze dosáhnout i s použitím kapilární elektroforézy (Smith *et Nelson*, 1998). Za nedenaturujících podmínek je možno s jistotou rozlišit polymorfismus délky 3 bp (Wang *et al.*, 2003). PAA gely mohou být barveny ethidium bromidem (nedenaturující) či dusičnanem stříbrným (denaturující). Barvení stříbrem je asi 3x citlivější než barvení ethidium bromidem a umožňuje identifikovat až 1 pg dvouvláknové DNA na 1mm² sekvenačního gelu (Bassam *et al.*, 1991).

Poprvé byly mikrosatelity jako markery použity koncem 80. let u člověka (Litt *et Luty*, 1989, Weber *et May*, 1989). Mapování s pomocí mikrosatelitů bylo prováděno zprvu u živočichů (tur, Bishop *et al.*, 1994; člověk, Dib *et al.*, 1996), později začaly být mikrosatelity využívány také u rostlin (rýže, Wu *et Tanksley*, 1993; ječmen, Saghai-Maroo *et al.*, 1994; pšenice, Röder *et al.*, 1998).

Mikrosatelity se zdají být vhodným nástrojem pro mapování genomu pšenice. Oproti jiným markerovým systémům vykazují vyšší úroveň polymorfismu i u velmi příbuzných odrůd a linií. Velká část mikrosatelitů mapovaných u pšenice je genomově specifická (přibližně 50%) a pokud jsou amplifikovány i mikrosatelitové lokusy z dalších genomů, jsou dobře odlišitelné (Ganal *et Röder*, 2007). U pšenice jsou SSR markery využívány zejména k MAS, dále byly použity k lokalizaci nejrůznějších genů na jednotlivé chromozomy pšenice (Röder *et al.*, 2004), včetně QTL zodpovídajících za morfologické i agronomicky významné znaky (Perretant *et al.*, 2000; Borner *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003, 2004) a také k charakterizaci různých odrůd a linií pšenice (Donini *et al.*, 2000;

Christiansen *et al.*, 2002; Pestsova *et Röder*, 2002). První mikrosatelitovou mapu pšenice publikovali Röder *et al.* roku 1998. Později byly vytvořeny další mikrosatelitové mapy nebo zahuštěny mapy stávající (Gupta *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Pestsova *et al.* (2000) a později Guyomarc'h *et al.*, (2002) odvodili nové SSR markery z genomu *Aegilops tauschii*, diploidního předka pšenice, za účelem zvýšení počtu mikrosatelitových markerů specifických pro D genom *T. aestivum*.

ISBP (insertion site based polymorphism)

Markery ISBP jsou odvozené z repetitivních oblastí genomu (Paux *et al.*, 2006). Tyto oblasti obsahují transponovatelné elementy, které se dokážou vkládat do jiných sekvencí, včetně jiných transponovatelných elementů. Vkládáním transponovatelných elementů vznikají unikátní spoje. Ty se mohou nacházet mezi dvěma repetitivními sekvencemi, dále mezi repetitivní a kódující sekvencí nebo mezi repetitivní a nízkokopiovou nekódující sekvencí. Markery ISBP jsou založeny na amplifikaci těchto unikátních spojů a přilehlých oblastí. Na obdobné principu jako markery ISBP fungují také markery RJM (*repeat DNA junction markers*) – markery ze styčných bodů repetitivních (Devos *et al.*, 2005). Základem obou těchto technik je přítomnost polymorfismu založeného na inzerci retrotranspozónu (RBIP, *retrotransposon-based insertion polymorphism*, Flavel *et al.*, 1998).

Primery pro amplifikaci markerů ISBP mohou být navrženy na dvě místa spojů nebo je jeden primer specifický pro místo inzerce a druhý je navržen na přilehlý úsek DNA. Pro odvození primerů musí být známa sekvence místa inzerce transponovatelného elementu. Cenným zdrojem těchto markerů jsou sekvence získané sekvenováním konců BAC klonů (BES, *BAC-end sequences*; Paux *et al.*, 2006). Za účelem navrhování primerů pro ISBP markery je používán program *IsbpFinder*, jenž dokáže detekovat místa spojů a navrhnout na ně specifické primery (Paux *et al.*, 2010).

Markery ISBP jsou unikátní, polymorfní a genomově specifické. Vysoká míra polymorfismu je dána tím, že transponovatelné elementy jsou dynamickou součástí genomu (Paux *et al.*, 2010). Markery ISBP mohou vykazovat polymorfismus na úrovni přítomnosti nebo nepřítomnosti produktu PCR. Pak se jedná o dominantní marker. Tato forma ISBP se vyhodnocuje na agarózových gelech. Paux *et al.* (2010) ve své práci uvádějí, že nejméně 50% markerů ISBP mapovaných na chromozóm 3B pšenice, vykazuje takto hodnotitelný polymorfismus. Pokud dojde k amplifikaci produktu, může být nalezen

polymorfismus i na sekvenční úrovni. V tomto případě se jedná o jednonukleotidové polymorfismy, krátké inserce či delece nebo mikrosatelity, které jsou součástí markeru ISBP.

Markery ISBP jsou vhodným systémem zejména pro organismy, jejichž genom obsahuje velké množství repetitivních sekvencí a vykazuje nižší úroveň polymorfismu. Využití nalézají tyto markery při konstrukci genetických a fyzických map, při ukotvování kontigů a také jsou využívány při radiačním hybridním mapování. Dále mohou být využity pro fylogenetické studie a studium evoluce transponovatelných elementů.

První markery ISBP na pšenici byly odvozeny z analýzy sekvencí získaných sekvenováním konců BAC klonů pocházejících z 3B specifické BAC knihovny DNA (Paux *et al.*, 2006). Paux *et al.* (2010) ve své publikaci uvádí odvození 711 markerů ISBP specifických pro chromozóm 3B pšenice. Tyto markery byly využity v rámci konstrukce fyzické mapy chromozómu 3B (Paux *et al.*, 2008) a dále při studiu genu rezistence ke rzi travní (*Sr2*) u pšenice (McNeil *et al.*, 2008). Bartoš *et al.*, (2008) vyvinuli 12 markerů ISBP specifických pro krátké rameno chromozómu 1R (1RS) žita.

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism)

Markery IRAP (Kalendar *et al.*, 1999) pocházejí stejně jako markery ISBP z repetitivních oblastí v genomu. Většina retrotranspozónů, které jsou součástí repetitivní složky genomu, je ohraničena dlouhými terminálními repeticemi (LTR, *long terminal repeat*). LTR obsahují sekvence nezbytné pro expresi a integraci retrotranspozónu a jsou vysoce konzervativní. Markery IRAP jsou založeny na amplifikaci úseků DNA mezi retrotranspozóny. Amplifikace je započata z LTR sekvencí.

Primery pro amplifikaci jsou navrhovány na oblasti LTR a směřují ven z retrotranspozónu. To, zda dojde či nedojde k amplifikaci, závisí na vzdálenosti LTR sekvencí. Výsledkem PCR je velké množství produktů lišících se délkou (proužky na elektroforetickém gelu) - markery IRAP vytvářejí fingerprinty. Délka vzniklých produktů sahá od 100 bp až po několik kilobází, v závislosti na vzdálenosti LTR sekvencí. Ke vzniku nového proužku v rámci spektra produktů PCR dochází inzercí retrotranspozónu do místa, kde se dosud nenacházel. Ke ztrátě proužku může naopak dojít mutací v místě nasedání primeru nebo dominantní amplifikací jiného bandu. Detekční metoda je závislá na množství amplifikovaných produktů. V případě menšího počtu produktů je možné využít agarózových gelů a barvení ethidium bromidem. Pokud je množství proužků tak velké, že je není možné na agarózovém gelu rozlišit, používají se sekvenační PAA gely.

Markery IRAP jsou dominantními markery, na gelu se tedy vyhodnocuje přítomnost nebo nepřítomnost daného produktu PCR. Využití nalézají zejména u organismů s vysokou hustotou retrotranspozónů v genomu. Markery IRAP byly od svého uvedení do praxe využity u celé řady rostlinných druhů, např. u ječmene (Kalendar *et al.*, 2000), *Aegilops tauschii* (Boyko *et al.*, 2002), banánovníku (Teo *et al.*, 2005), slunečnice (Vukich *et al.*, 2009) a dalších.

Na podobném principu jako markery IRAP fungují markery REMAP (Kalendar *et al.*, 1999). V případě těchto markerů je však amplifikována oblast mezi hraniční LTR sekvencí retrotranspozónu a mikrosatelitovou sekvencí.

SNP (single nucleotide polymorphism)

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) jsou kodominantní markery s polymorfismem na sekvenční úrovni. Představují nejmenší jednotku genetické variace mezi jedinci a jsou současně největším zdrojem polymorfismů v organismech. Například u člověka představují SNP 90% veškerého polymorfismu DNA (Collins *et al.*, 1998). Teoreticky mohou mít tyto markery dvě, tři nebo čtyři alely (varianta nukleotidů A, C, T, G). Tří- a čtyřalelové SNP se však prakticky nevyskytují. Proto jsou SNP považovány za bialelické markery. Mezi SNP jsou řazeny také krátké inserce a delece několika málo nukleotidů.

Pro jednonukleotidové polymorfismy je charakteristické vytváření haplotypů. Jedná se o kombinace SNP, které se vyskytují podél chromozómu a segregují jako jedna alela. Tyto úseky SNP mohou mít délku od stovek párů bází až po několik kilobází. Výskyt haplotypů může výrazně usnadnit analýzu velkého počtu těchto polymorfismů najednou, protože nemusí být hodnocena každá záměna nukleotidu zvlášť.

Hledání jednonukleotidových polymorfismů se děje buď sekvenováním daného lokusu u zkoumaných jedinců a následným porovnáním sekvencí, nebo je možné SNP vyhledávat *in silico* v databázích např. porovnáváním EST sekvencí. Analýza jednonukleotidových polymorfismů probíhá s využitím vysokokapacitních metod, zejména na bázi různých typů DNA čipů (arrayí).

U člověka byl identifikován 1 SNP každých 1000 bp (Kwok *et al.*, 1996). Genom kukuřice obsahuje 1 SNP na 40 - 104 bp (Ching *et al.*, 2002; Batley *et al.*, 2003; Vroh Bi *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2009). Hustota markerů SNP u pšenice je poměrně nízká, asi 5x nižší než u kukuřice. Jeden jednonukleotidový polymorfismus připadá v pšeničném

genomu průměrně na každých 540 bp (Somers *et al.*, 2003), což je srovnatelné například s hustotou SNP v genomu sóji nebo rajčete (Zhu *et al.*, 2003).

Přítomnost tří subgenomů v genomu pšenice výrazně komplikuje objevování i následnou analýzu jednonukleotidových polymorfismů. V případě sekvenování žádaného lokusu primery obvykle amplifikují i lokusy z ostatních subgenomů. Tomuto může částečně předcházet použití primerů specifických pro daný genom, které však nemusí být stoprocentně spolehlivé. Dalším řešením je subklonování produktů PCR a následná selekce žádaného produktu pro sekvenování. Vhodnější cestou pro hledání SNP u pšenice je porovnávání pšeničných EST sekvencí z různých linií a odrůd uložených v databázích. V současné době probíhá HapMap projekt zaměřený na pšenici zabývající se objevováním a mapováním SNP v tetraploidních a hexaploidních druzích pšenice (<http://wheat.pw.usda.gov/SNP>). Složitost genomu pšenice zatím neumožňuje využití vysokokapacitních systémů pro analýzu SNP. V současné době mají SNP u pšenice význam spíše při analýze individuálních genů (Ganal *et Röder*, 2007).

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Pro optimalizaci metod vhodných pro analýzu genotypu a pro následné odvozování nových markerů byla použita DNA izolovaná z rostlin mapovací populace $F_{2:3}$ pšenice seté (*Triticum aestivum*) pocházející z křížení linie CI 2401 (rezistentní) s odrůdou Glupro (citlivá). Mapovací populace byla poskytnuta prof. Norou Lapitan (Colorado State University, Colorado, USA). Dále byla použita DNA rodičů mapovací populace a DNA ramene 7DS tříděného pomocí průtokové cytometrie z double-ditelozomické linie 7D odrůdy Chinese Spring. Tato DNA byla amplifikována pomocí polymerázy Phi 29 (Šimková *et al.*, 2008).

4.1.2 Přístrojové vybavení

96-kapilárový sekvenátor 3730xl DNA analyzer, (Applied Biosystems, USA)

Biologický termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Dokumentační systém pro analýzu elektroforetického gelu ChemiGenius Bioimaging System (Syngene, GB) s transiluminátorem model GVM20 (Syngene, GB)

Elektroforetická aparatura C-DASG-400-50: Dual Adjustable Mega-Gel Kit (C.B.S. Scientific, USA)

Elektroforetický zdroj EV232 (Consort, Belgie)

Elektroforetický zdroj Standard Power Pack P25 (Biometra, Německo)

Elektroporátor Cell-Porator (Life Technologies, USA)

Homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo)

Chlazená centrifuga Jouan Cr4i (Thermo Scientific, USA)

Magnetická destička 96 DIRECT INJECT MAGNET (Beckman Coulter, USA)

Negatoskop NEGA1 (Maneko, ČR)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra, USA)

Skener EPSON GT-15000 (SEIKO EPSON Corporation, Japonsko)

Stolní centrifuga IEC Micromax RF (Thermo Scientific, USA)

Sušárna HS 122S (Chirana, ČR)

Termocyklér C1000 Thermal Cyclor (Bio-Rad, USA)

Třepačka Forma Orbital Shaker 420 (Thermo Scientific, USA)

Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International, USA)

Vodní lázeň GRANT SUB6 (Grant Instruments, GB)

4.1.3 Chemikálie

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva, Německo)

Akrylamid (Serva, Německo)

Akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19:1, 40% roztok (Fluka Analytica, USA)

Bromfenolová modř (Serva, Německo)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosid trifosfáty dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Fermentas, Kanada)

Dusičnan stříbrný (Lachema, ČR)

Ethanol – 96% roztok (Lachema, ČR)

Ethidium bromid (Sigma Chemical, USA)

Exonukleáza I (Fermentas, Kanada)

Formaldehyd (AppliChem, Německo)

Formamid (AppliChem, Německo)

Formamid Hi-Di (Applied Biosystems, USA)

Isopropanol (Lachema, ČR)

Kanamycin, (Serva, Německo)

Kyselina dusičná (Lachema, ČR)

Kyselina octová – ledová (Lachema, ČR)

Lyzační pufr P2 (QIAGEN, Německo)

Močovina (Lachema, ČR)

N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin (TEMED) (Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, USA)

N,N'- methylenbisakrylamid (Serva, Německo)

Neutralizační pufr P3 (QIAGEN, Německo)

Peroxodisíran amonný (APS) (Fluka BioChemika, Švýcarsko)

Primery (Invitrogen, USA)

Rain-X – přípravek odpuzující vodu ze skel automobilů (Pennzoil-Quaker State, USA)

Resuspenzační pufr P1 (QIAGEN, Německo)

Ribonukleáza A (Invitrogen, USA)

Taq polymeráza

Termosensitivní alkalická fosfatáza FastAP (Fermentas, Kanada)
Thiosíran sodný (Lachema, ČR)
Uhličitan sodný (Lachema, ČR)
Velikostní marker GeneRuler, 100bpDNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada)
Velikostní marker O'Range 20 bp DNA Ladder ready to use (Fermentas, Kanada)
Velikostní standard pro fragmentační analýzu GeneScan-500 Liz Size Standard (Applied Biosystems, USA)
Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem, Německo)

4.1.4 Komerční kity

Agencourt[®] AMPure (Beckman Coulter, USA)
Agencourt[®] CleanSEQ (Beckman Coulter, USA)
Agencourt[®] CosMCPrep (Beckman Coulter, USA)
Agencourt[®] Genfind v2 (Beckman Coulter, USA)
BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA)
Invisorb[®] Spin PCRapid Kit (Invitek, Německo)
Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit (Invitek, Německo)
One Shot[®] TOP10 Electrocomp Cells (Invitrogen, USA)
TOPO[®] XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, USA)

4.1.5 Pufry, roztoky a média

4.1.5.1 Pufry

10 x PCR pufr

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

Lyzační pufr pro izolaci DNA

Základní lyzační pufr

0,5M NaCl
0,1M Tris-HCl
0,05M EDTA

0,5% (w/v) thiosíran sodný
0,1% (w/v) kyselina askorbová
1% (w/v) polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)
0,04% (w/v) proteináza K*

* proteináza K je součástí kitu Agencourt® Genfind v2

Nanášecí pufr pro elektroforézu v denaturujícím polyakrylamidovém gelu

80% formamid
0,1 % (w/v) bromfenolová modř
0,1% (w/v) xylenová modř

STOP C pufr

100 mM EDTA (pH8)
1 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) bromfenolová modř
0,05 % (w/v) xylenecyanol
42,5 % glycerol

TBE pufr

10x	5x	0,5x
890 mM Tris báze	445 mM Tris báze	45 mM Tris báze
890 mM kyselina boritá	445 mM kyselina boritá	45 mM kyselina boritá
20 mM EDTA	10 mM EDTA	1 mM EDTA
pH 8		

4.1.5.2 Roztoky

Denaturující 6% polyakrylamidový gelu

6% akrylamid:bisakrylamid (19:1)
7M močovina
0,066 % (v/v) TEMED
0,066 % (w/v) APS
0,5x TBE

Nedenaturující 4% , 6% a 8% polyakrylamidový gel

4%, 6% nebo 8% akrylamid:bisakrylamid (19:1)

0,073 % (v/v) TEMED

0,066 % (w/v) APS

0,5x TBE pufr

Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného

1% (w/v) dusičnan stříbrný

0,15% (v/v) formaldehyd

Vývojka

3% (w/v) uhličitan sodný

0,15% (v/v) formaldehyd

2 µg/ml thiosíran sodný

4.1.5.3 Média

2 YT médium

enzymový kaseinový hydrolyzát 16 g/l

kvasničný autolyzát 10 g/l

NaCl 5 g/l

Agar 16 g/l

LB médium

enzymový kaseinový hydrolyzát 10 g/l

kvasničný autolyzát 5 g/l

pepton 5 g/l

NaCl 10 g/l

pH 7,2 – 7,4

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace DNA

DNA byla izolována buď s pomocí kitu Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit nebo metodou vysokokapacitní izolace DNA, která je založená na modifikovaném postupu izolace kitem Agencourt[®] Genfind v2.

4.2.1.1 Vysokokapacitní izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna s pomocí komerčního kitu Agencourt[®] Genfind v2 původně určeného k izolaci DNA z krve. Postup izolace byl modifikován a optimalizován pro izolaci DNA z rostlinného materiálu (listy pšenice). Izolace kitem Agencourt[®] Genfind v2 je založena na vazbě molekul DNA na magnetické kuličky, které jsou v průběhu extrakce DNA magnetem imobilizovány na stěnách jamek 96-jamkové misky, aby mohla být izolovaná DNA přečištěna.

Vzorek rostlinného materiálu byl odebírán z mladých listů rostlin pšenice, pocházejících ze studované mapovací populace F_{2:3}. Odebraný materiál byl sušen 48 h při 37 °C a poté homogenizován skleněnými kuličkami o průměru 0,5 cm s pomocí homogenizačního oscilačního mlýna. K homogenizovaným vzorkům bylo přidáno po 1 ml lyzačního pufru. Vzorky byly inkubovány 45 min při 65 °C ve vodní lázni. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 min při 1300 g a 4 °C. Následně bylo po 100 µl supernatantu přepipetováno do nové 96-jamkové misky. Ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl magnetických kuliček a 1 µl ribonukleázy A (koncentrace 30 mg/ml), vše bylo promícháno pipetováním a dále bylo přidáno 70 µl isopropanolu. Vzorky byly inkubovány 5 min při laboratorní teplotě, aby došlo k navázání DNA na magnetické kuličky. Po uplynutí doby inkubace byly kuličky imobilizovány magnetem na stěnách jamek, zbylý roztok byl odebrán a miska sejmuta z magnetu. DNA navázaná na kuličkách byla postupně přečištěna roztokem Washing buffer I (dvakrát) a Washing buffer II tak, že bylo ke vzorku přidáno vždy 100 µl roztoku, vše bylo promícháno pipetováním, miska byla umístěna na magnet a roztok byl odpipetován. Po odebrání roztoku Washing buffer II byla miska sejmuta z magnetu a ke kuličkám s navázanou DNA bylo přidáno 40 µl deionizované vody, aby došlo k eluci DNA. V posledním kroku byly kuličky magnetem imobilizovány na stěnách jamek a voda obsahující DNA byla odebrána do nové 96-jamkové misky. Před použitím byla DNA uskladněna při teplotě -20 °C.

4.2.2 Metody pro analýzu genotypu za pomoci mikrosatelitových markerů

V blízkosti studovaného genu *Dn_{CI2401}* bylo již dříve zamapováno několik mikrosatelitových markerů (viz obr. 2).

4.2.2.1 Analyzované markery

K analýze genotypu v mapovací populaci byly vybrány markery *cf_{d14}*, *cf_{d68}* a *gwm₄₇₃*, které se nacházejí dostatečně blízko genu (viz obr. 2) a ve srovnání s ostatními markery v okolí jsou nejlépe hodnotitelné. Charakteristika těchto markerů je uvedena v tabulce 4.

Tab. 4: Charakteristika vybraných markerů

Marker		Sekvence primeru	SSR motiv	Délka produktu PCR v Glupro a CI 2401 (bp)
<i>cf_{d14}</i>	F	CCACCGGCCAGAGTAGTATT	TC	přibližně 150 (+/-2)*
	R	TCCTGGTCTAACAACGAGAAGA		
<i>cf_{d68}</i>	F	TTTGCAGCATCACACGTTTT	GT	209, 211
	R	AAAATTGTATCCCCCGTGGT		
<i>gwm₄₇₃</i>	F	TCATACGGGTATGGTTGGAC	(GT) ₁₄ (TTGG)(GT) ₈	225, 227
	R	CACCCCTTGTGGTCAC		

* délka je určena na základě porovnání s velikostním markerem (20 bp ladder) na nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu

4.2.2.2 Amplifikace markerových lokusů pomocí PCR

Před vlastním testováním technik detekce byla pomocí PCR za standardních podmínek amplifikována DNA s použitím primerů pro markery *cf_{d14}*, *cf_{d68}* a *gwm₄₇₃*. Templátem byla DNA rodičů mapovací populace izolovaná kitem Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit a DNA jedinců mapovací populace izolovaná kitem Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit nebo vysokokapacitní metodou za použití kitu Agencourt[®] Genfind v2. Pro testování byly vybrány všechny možné genotypy (dominantní homozygot - A, recesivní homozygot - B a heterozygot - H), aby bylo možno porovnat citlivost jednotlivých metod při rozlišování genotypů. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 5, reakční podmínky specifické pro jednotlivé primery jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem	Koncentrace v reakční směsi
10x PCR pufr	2 µl	1x
10 mM dNTPs	0,4 µl	200 µM
10µM primer F	2 µl	1 µM
10µM primer R	2 µl	1 µM
Taq polymeráza (4 U/µl)	0,4 µl	0,08 U/µl
DNA (10 – 25 ng/µl)	2 µl	1 – 2,5 ng/µl
Deionizovaná H ₂ O	11,2 µl	-
Celkový objem	20 µl	-

Tab. 6: Podmínky PCR

	<i>cf_d14</i>		<i>cf_d68</i>		<i>gwm473</i>	
Počáteční denaturace		94 °C 5 min		94 °C 5 min		94 °C 5 min
Denaturace		94 °C 30 s		94 °C 30 s		94 °C 30 s
Nasedání primeru*	40x	55 °C 30 s	40x	60 °C 30 s	40x	55 °C 30 s
Elongace		72 °C 30 s		72 °C 30 s		72 °C 1 min
Závěrečná elongace		72 °C 10 min		72 °C 10 min		72 °C 10 min

*Teplota nasedání primerů byla zjištěna v databázi GrainGenes 2.0 (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>)

4.2.2.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza byla prováděna na 96-kapilárovém sekvenátoru 3730xl DNA analyzer, Applied Biosystems. Před vlastní separací byla DNA amplifikována pomocí PCR, při které došlo k fluorescenčnímu označení produktů. Oproti standardnímu složení reakční směsi pro PCR byl v této reakci F primer zaměněn za primer Fext a současně byl do reakce přidán fluorescenčně značený primer M13 6-FAM (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). Primer Fext je tvořen sekvencí shodnou se sekvencí standardního F primeru, prodlouženou o 19 nukleotidů komplementárních k M13 6-FAM značenému primeru. Kombinace těchto primerů umožňuje fluorescenční označení produktu amplifikace. Vlastní PCR probíhala v objemu 20 µl. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 7. Amplifikace probíhala v termocykleru za podmínek specifických pro použité primery (viz tab. 6). Tato metoda byla použita pro analýzu genotypu markerů *cf_d68* a *gwm473*.

Tab. 7: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem	Koncentrace v reakční směsi
10x PCR pufr	2 µl	1x
10 mM dNTPs	0,4 µl	200 µM
10 µM primer R	0,2 µl	0,1 µM
10 µM primer Fext	0,16 µl	0,08 µM
10 µM primer M13 6-FAM	0,12 µl	0,06 µM
Taq polymeráza	0,4 µl	0,08 U/µl
DNA (10 – 25 ng/µl)	2 µl	1 – 2,5 ng/µl
Deionizovaná H ₂ O	14,7 µl	-
Celkový objem	20 µl	-

Po amplifikaci byly produkty PCR purifikovány kitem Agencourt[®] AMPure. Po přečištění bylo ke každému vzorku přidáno 10 µl formamidu Hi-Di a 0,2 µl velikostního standardu GeneScan-500 Liz Size standard. Vzorky byly denaturovány v termocycleru 2 min při 98 °C, poté ihned vloženy na led a následně byla provedena kapilární elektroforéza na sekvenátoru. Výsledky byly vizualizovány a vyhodnoceny v programu GeneMarker V1.75 (SoftGenetics, LLC).

4.2.2.4 Elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza byla prováděna na zařízení C-DASG-400-50 s velikostí skel 500 x 220 mm, mezerníky vymezujícími tloušťku gelu 1 mm a hřebenem, jenž umožňuje vytvoření 100 jamek v gelu. Touto technikou byly analyzován pouze marker *cf14*.

Smícháním jednotlivých složek byl připraven 6% nedenaturující polyakrylamidový gel, který byl nalit mezi utěsněná elektroforetická skla. Polymerizace probíhala po dobu 45 min. Mezitím byl katodový i anodový prostor aparatury naplněn přibližně 800 ml 0,5x pufru TBE a do pufru v anodovém prostoru byl přidán roztok ethidium bromidu do konečné koncentrace 1 µg/ml. Po ztuhnutí gelu byla skla s gelem vložena do aparatury a byl spuštěn tzv. 'prerun' aby došlo k nasycení gelu ethidium bromidem. 'Prerun' probíhal při napětí 300 V 45 min. Po uplynutí této doby mohly být do jednotlivých jamek gelu naneseny vzorky DNA smíchané s pufrům 6x STOP C. Vzorky byly míchány v poměru 4 µl PCR produktu k 1 µl pufru 6x STOP C a celý objem 5 µl byl nanášen na gel. Do prvních a posledních dvou jamek byly naneseny velikostní standardy 20 bp ladder a 100 bp ladder. Separace vzorků probíhala vždy 45 min při napětí 350 V. Po této době byl gel prohlédnut na transiluminátoru a vyfocen. V případě, že produkty PCR nebyly dostatečně rozděleny, probíhala separace dále při stejných podmínkách. Doba dalšího

dělení závisela na délce analyzovaných polymorfních produktů PCR. Po dokončení separace byl gel opět vyfotografován a následně vyhodnocen.

4.2.2.5 Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu

Elektroforetická separace produktů PCR

Poslední z testovaných metod byla polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek optimalizovaná pro vyhřívanou sekvenční elektroforetickou komůrku S2 Whatman Biometra (rozměr skel 333 x 392 x 418 mm, tloušťka gelu 4 mm). Tato metoda byla použita pro analýzu genotypu všech tří markerů (*cf14*, *cf68* a *gwm473*).

Elektroforetická skla byla před použitím ošetřena na straně, která je v kontaktu s gelem, specifickými látkami. Přední delší sklo bylo potřeno přípravkem proti ulpívání vody na sklech automobilů a zadní kratší sklo bylo silanizováno 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 μ l/ml 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu, který působí jako molekulární lepidlo. Silanizace zapříčiní přilepení gelu k ošetřenému sklu, což má význam při následné manipulaci s gelem. Smícháním jednotlivých složek roztoku byl připraven 6% denaturující PAA gel, roztok byl nalit mezi elektroforetická skla a ponechán 45 min, aby došlo k dokonalé polymerizaci. Katodový i anodový prostor aparatury byl naplněn pufrům 0,5x TBE. Po uplynutí doby nezbytné pro polymerizaci byla skla s gelem vložena do elektroforetické aparatury a vytemperována na teplotu 50 – 58 °C (na zdroji byly nastaveny hodnoty 90W a 3000V). Gel byl takto přehříván asi 30 min. Poté byl mezi skla do gelu vložen 1 mm hluboko hřebínek (typ *sharktooth* MP). Vzorky byly připraveny smícháním produktu PCR s nanášecím pufrům v poměru 2:1 a následně denaturovány 3 min při 96 °C v termocycleru. Po dokončení denaturace byly ihned umístěny na led, aby nedošlo k opětovné renaturaci vláken DNA. Na gel bylo nanášené po 2 μ l každého vzorku. Vlastní dělení produktů PCR probíhalo při výkonu 70W (počáteční hodnota napětí byla nastavena na 3000 V). Doba dělení byla závislá na délce dělených molekul DNA. Po ukončení separace byla skla vyjmuta z aparatury a oddělena od sebe. Gel přichycený ke kratšímu sklu byl barven stříbrem.

Vizualizace produktů PCR

V první fázi bylo sklo s přilepeným gelem vloženo na minimálně 20 min do 10% roztoku kyseliny octové (fix/stop roztok). Tím došlo k fixaci DNA v gelu a vyplavení

močoviny. Následně byl gel od kyseliny octové několikrát opláchnut v deionizované vodě a vložen na 5 min do 1% roztoku kyseliny dusičné, která by měla zabránit vzniku nescifického pozadí. Po 5 minutách byla kyselina dusičná z gelu několikrát vymyta deionizovanou vodou a sklo s gelem bylo vloženo na 30 min do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného s přídavkem formaldehydu. Od přebytečného stříbra byl gel opláchnut v deionizované vodě a vložen do vychlazené vývojky (4 °C), do kterého byl před použitím přidán formaldehyd a thiosíran sodný. Ve chvíli, kdy byly PCR produkty dostatečně obarveny, byla reakce zastavena snížením alkalického pH uhličitanu sodného přidáním fix/stop roztoku. Po dokončení barvení byl gel vysušen a vyhodnocen s pomocí negatoskopu a následně naskenován.

4.2.3 Odvozování markerů pro zahuštění genetické mapy v oblasti genu

Dn_{CI2401}

Za účelem zahuštění genetické mapy v oblasti genu *Dn_{CI2401}*, bylo otestováno celkem 52 potenciálních markerů na polymorfismus mezi rodiči mapovací populace. Mezi těmito markery bylo 14 mikrosatelitových (SSR) markerů (tab. 8), 33 markerů ISBP (tab. 9 a tab. 10) a 5 markerů IRAP (tab. 11). Primery pro testované markery byly odvozeny ze sekvencí BAC klonů pocházejících z knihovny DNA specifické pro krátké rameno chromozómu 7D (7DS) (Šafář *et al.*, 2010). BAC klony z této knihovny byly fingerprintovány a uspořádány do kontigů. Skríníngem knihovny markery *cf_{d68}* a *gwm₄₇₃* byly nalezeny klony náležící do kontigu *ctg₂₄₄* a *ctg₂₈₅* respektive. Primery pro nové markery byly navrženy na základě znalostí koncových sekvencí (BES) 7 BAC klonů pocházejících z kontigu *ctg₂₈₅*, a dále kompletní sekvence 4 BAC klonů (2 z kontigu *ctg₂₄₄* a 2 z kontigu *ctg₂₈₅*) osekvenovaných technologií 454. Primery pro mikrosatelitové markery byly navrženy pomocí programu SciRoKo (Köfler *et al.*, 2007), zatímco markery ISBP byly navrženy s využitím programu *ISBPFinder* (Paux *et al.*, 2010), případně manuálně za použití databáze TREP (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/Repeats/>) a programu Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Databáze TREP a program Primer3 byly použity i pro navržení primerů pro markery IRAP (Kalendar *et al.*, 1999).

Tab. 8: Přehled testovaných SSR markerů odvozených z kompletních sekvencí BAC klonů

Označení	Sekvence primeru		Motiv	Délka produktu PCR v Chinese Spring (bp)	BAC klon, kontig
MS 1	F	AAAACCACCCAATCAAACCA	AC	234	7D042K15, ctg244
	R	TTGCTAAAGAATGCGCTGTG			
MS 2	F	CGTCGACACATTGCACTACC	CCG	173	7D042K15, ctg244
	R	AGGTAAACATGAAGCGCTGG			
MS 3	F	CGTGGAGAGGATCAAGGCTA	AGG	229	7D086C17, ctg285
	R	CCGCAGTAATCCTAAACCCA			
MS 4	F	GGGGAGGTGCTACTGTTTGA	ATCC	233	7D086C17, ctg285
	R	GGTGTGGAGGTGGAGAAAA			
MS 5	F	GCAAGCTCTGGTACTGCCTC	ACG	235	7D086C17, ctg285
	R	GGCAAGAGTAACCGATGGAA			
MS 6	F	TCCGAAGAACAATACCGCTC	ACCTC	150	7D086C17, ctg285
	R	CTTCTGGCTACTTGCCTGG			
MS 7	F	TGCTATGAGCTGTTGCTGCT	AGC	247	7D086C17, ctg285
	R	TGGTCCAAGTGGCTGGTTAT			
MS 8	F	GATCAGGGTTGATGCTGTGA	AATTC	158	7D070I12, ctg285
	R	TTGCGGAAGTTGAGTCCTTT			
MS 9	F	CATCACGTCACCACCTGTTC	AC	245	7D070I12, ctg285
	R	TGGCTGCTCATGTTCTTGTG			
MS 10	F	GAGGGAAGGTTGGAAGAAGG	ACGGC	228	7D070I12, ctg285
	R	GGTCCAGACGGAAAACAAGA			
MS 11	F	ATGCATCCATCCATGTGTGT	ATGC	198	7D070I12, ctg285
	R	ACGTAAGCCTTTGCACTGCT			
MS 12	F	GAATCGGGCTTTTAACTGAAT	AAC	250	7D090I05, ctg244
	R	TTGAGTACCCAAACAGGGCT			
MS 13	F	TTGCCAAGGAGGTAATCTGG	AG	187	7D090I05, ctg244
	R	TTTGAGTTGATGTCGCCAAG			
MS 14	F	ACAATGGGATTCCAGCAGAG	AG	164	7D086C17, ctg285
	R	AAACGGTGTGCATGCAAGT			

Tab. 9: Přehled testovaných ISBP markerů odvozených z kompletních sekvencí BAC klonů

Označení	Sekvence primeru		Délka produktu PCR v Chinese Spring (bp)	BAC klon, kontig
ISBP 1	F	GGGATCTAGCATTGTTGGGGTT	414	7D042K15, ctg244
	R	TGTTCTCACTGCGAGTGCC		
ISBP 2	F	AACACATAGCCGAAAATGGC	424	7D042K15, ctg244
	R	GGTTGCAAGTTCACTGGAT		
ISBP 3	F	TCCTTGTCTTGTGTTGCGTC	530	7D042K15, ctg244
	R	TTCCACTAAGGCCCATGAAC		
ISBP 4	F	TTATATACGGGGGAGGGAGC	476	7D086C17, ctg285
	R	TGAATATTGGCATCACGTCC		
ISBP 5	F	CCGGCCTCATGTGATAGTTT	495	7D086C17, ctg285
	R	GACGTAGATCTCAGAGCGCC		
ISBP 6	F	AACACATAGCCGAAAATGGC	510	7D086C17, ctg285
	R	GGAATTTTGGACCTTCGTGA		
ISBP 7	F	CGATCCAATGCCTACGAGAT	476	7D070I12, ctg285
	R	GCAATCGCCCTGTAATTGTT		
ISBP 8	F	ATGCTACCGCTGAACAAACC	584	7D070I12, ctg285
	R	CGGTGAGCATCATGAAATTG		
ISBP 9	F	TAGCAATGCAATGAGCTTGG	463	7D070I12, ctg285
	R	ACGGACCCCCTCTTGATAGT		
ISBP 10	F	CCACCCTCACACTTTACCGT	516	7D090I05, ctg244
	R	TGTGTTTTGGCATTGAGCTC		
ISBP 11	F	TAACCAATCGCCGGTCTATC	460	7D090I05, ctg244
	R	CTACACCTCTTGGCTGGCTC		
ISBP 12	F	AGAGGAAGAGGGCTACGAGG	518	7D090I05, ctg244
	R	GCATTTGGACTCCGTCTGAT		
ISBP 13	F	GGTTTCATTCCGTTTGCAC	440	7D070I12, ctg285
	R	TGAATAGGGAGAATGCTGGC		
ISBP 14	F	AGTGAACCTGTGTCTTGGG	548	7D070I12, ctg285
	R	CTCCAGGGTGTCTTGTGGT		
ISBP 15	F	CTCCCGCTCTAATGGATGA	567	7D070I12, ctg285
	R	CAGCATCAGTCCGGGTTAGT		
ISBP 16	F	TCTCCCGATGAAGAAGAGGA	527	7D070I12, ctg285
	R	CAATATGCACCAACTGTGCC		
ISBP 17	F	GTGCCGTACGTTCCGGTAGTT	420	7D086C17, ctg285
	R	TAATCCAAAAGCGGGAATTG		
ISBP 18	F	CCCACTCGACCAGAAACATT	597	7D086C17, ctg285
	R	GAACATCGCGAAAGAAGGAG		
ISBP 19	F	TGTAAACCAGGATTCGAGG	407	7D086C17, ctg285
	R	CCAGGTGCGCCATTAGTAGT		
ISBP 20	F	CGATCTATTCTGTTCCCGA	543	7D086C17, ctg285
	R	GGCCAATGATGCATACTCCT		
ISBP 21	F	GGGACACACATGAATCGTGA	531	7D042K15, ctg244
	R	ACATCAACCGCGTTGTCATA		
ISBP 22	F	AGCGTCAACGCTGTAATCA	424	7D042K15, ctg244
	R	TCGATGCATTGAGGATTGAG		

Tab. 10: Přehled testovaných ISBP markerů odvozených z BES

Označení markeru		Sekvence primeru	Délka produktu PCR v Chinese Spring (bp)	BAC klon, kontig
ISBP 23	F	TGGGATATCTCATTTGTATGGACA	134	7D072I23, ctg285
	R	CAAGCACCCCTCTTGGTGTG		
ISBP 24	F	CACACCAAGAGGGTGCCTTG	207	7D072I23, ctg285
	R	TCGCATGTGTTAAAGGAGAGG		
ISBP 25	F	AGTCTACCTTGCAGGCAACC	335	7D070I12, ctg285
	R	CTGGAGCTGCACTCATCAAA		
ISBP 25	F	AGTCTACCTTGCAGGCAACC	498	7D070I12, ctg285
	R	TTCGACCACGTTGAAATTGA		
ISBP 27	F	AACACATTAGGAAAGCGCAAA	619	7D064L19, ctg285
	R	GCCAGCTTCCAAACAAAAG		
ISBP 28	F	AACACATTAGGAAAGCGCAAA	680	7D064L19, ctg285
	R	GCGAAAACCAACAGCAATC		
ISBP 29	F	AGGGGGAGATTGAAAGTGCT	267	7D025N09, ctg285
	R	AAACAACACCTCATCCCTTT		
ISBP 30	F	CGTTGGAGACGTATCATTGC	85	7D083M14, ctg285
	R	TCAACATAAAAGCATGATGCAA		
ISBP 31	F	AGCCCATTCGAGAACTTTT	217	7D083M14, ctg285
	R	AATGGGCGTATCAAGACCAG		
ISBP 32	F	TTTGGGAAGGCCCTGTAAGT	295	7D086C17, ctg285
	R	TTTCCCATGTCTTCCTTTGG		
ISBP 33	F	TGGTTAAGCTGATACCTCTCCAA	155	7D048I05, ctg285
	R	AAAACAGGAACTGGCACTGG		

Tab. 11: Přehled IRAP markerů odvozených z BES

Název	Sekvence primeru	BAC klon, kontig
IRAP 1	GTCAGACTAAAATAAGTTCCTTGGAT	7D072I23, ctg285
IRAP 2	ACCACCCAGGGATAGTAGCA	7D025N09, ctg285
IRAP 3	CGTTGGAGACGTATCATTGC	7D083M14, ctg285
IRAP 4	AATGGGCGTATCAAGACCAG	7D083M14, ctg285
IRAP 5	TGAGAGCAGGGAACAATCAA	7D048I05, ctg285

4.2.3.1 Amplifikace markerových lokusů pomocí PCR

PCR byla provedena standardním způsobem v objemu 30 μ l, složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 12. Podmínky PCR se pro jednotlivé primery lišily pouze v teplotě nasedání primeru T_a . Primery pro mikrosatelitové markery *MS 1 – MS 14* byly navrženy pro T_a 60 °C, pro markery *ISBP 1 – ISBP 22*, odvozené z kompletně osekvenovaných BAC klonů, byla T_a 58 °C a pro markery *ISBP 23 – ISBP 33* byla T_a 55 °C. Časový i teplotní profil PCR je uveden v tabulce 13. Jako templát pro PCR sloužila DNA izolovaná z rodičů mapovací populace (označení A a B), dále směs těchto dvou DNA v poměru 1:1, která

představovala heterozygotní genotyp (H), a jako pozitivní kontrola byl použit vzorek amplifikované DNA z krátkého ramene chromozómu 7D odrůdy Chinese Spring.

Tab. 12: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem	Koncentrace v reakční směsi
10x PCR pufr	3 µl	1x
10 mM dNTPs	0,6 µl	200 µM
10µM primer F	3 µl	1 µM
10µM primer R	3 µl	1 µM
Taq polymeráza (4 U/µl)	0,6 µl	0,08 U/µl
DNA (10 ng/µl)	3 µl	1 ng/µl
Deionizovaná H ₂ O	16,8 µl	-
Celkový objem	30 µl	-

Tab. 13: Podmínky PCR

Markery SSR a ISBP				Markery IRAP		
Počáteční denaturace		94 °C	5 min		95 °C	5 min
Denaturace	35x	94 °C	30 s	30x	95 °C	30s
Nasedání primeru		x °C	30 s		60 °C	1 min
Elongace		72 °C	30 s		72 °C	30s
Závěrečná elongace		72 °C	10 min		72 °C	30s

x označuje T_a, která je specifická pro jednotlivé primery

4.2.3.2 Separace produktů PCR na polyakrylamidovém gelu

Po provedení PCR byly všechny vzniklé produkty separovány a vizualizovány s využitím polyakrylamidové gelové elektroforézy za nedenaturujících podmínek. Na základě porovnání s pozitivní kontrolou byly identifikovány produkty specifické pro krátké rameno chromozómu 7D a bylo vyhodnoceno, zda jsou rodiče mapovací populace pro daný marker polymorfni. V případě mikrosatelitových markerů s délkou motivu 2 a 3 bp byla přítomnost či nepřítomnost polymorfismu ověřena s využitím elektroforézy v 6% denaturujícím PAA gelu. Markery s délkou repetitivního motivu 4 a 5 bp byly pro potvrzení výsledku testovány na 8% nedenaturujícím PAA gelu

4.2.3.3 Sekvenování ISBP lokusů

Markery ISBP, které na PAA gelu nevykazují polymorfismus charakteru přítomnosti nebo nepřítomnosti produktu PCR, mohou obsahovat polymorfismus na sekvenční úrovni. Z tohoto důvodu byly klonovány a následně sekvenovány produkty PCR

pro vybrané ISBP lokusy odvozené z BES. Byly vybrány takové lokusy, u nichž byl na elektroforéze patrný pouze jeden silný produkt, případně jeden silnější hlavní produkt a několik slabších o větší délce (přednostně dochází k zaklonování nejkratšího produktu). Produkty PCR, jejichž délka byla větší než 200 bp, byly sekvenovány z primerů vymezujících daný ISBP lokus. Produkty kratší než 200 bp byly sekvenovány z primerů M13 komplementárních k sekvenci plasmidu (M13 F 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', M13 R 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'). Pokud by u takto krátkých produktů byly použity specifické primery, nemuselo by dojít k překrytí sekvencí získaných z obou konců sekvenovaného úseku DNA, protože začátek čtení (prvních 20 – 100 bází) je obvykle nekvalitní.

Zaklonování PCR produktu

Vzorek DNA po PCR amplifikaci byl před samotným klonováním přečištěn kitem Invisorb® Spin PCRapid Kit, určeným k purifikaci PCR produktů. Přečištěná DNA byla použita pro zaklonování do vektoru a následnou transformaci.

Produkty PCR byly klonovány s využitím klonovacího kitu TOPO® XL PCR Cloning Kit. Vektorem pak byly transformovány elektrokompetentní bakterie *Escherichia coli*, které jsou spolu se S.O.C. médiem součástí kitu One Shot® TOP10 Electrocomp Cells. Ligační směs byla vytvořena smícháním 4 µl přečištěného produktu PCR s 0,3 µl klonovacího vektoru pCR®-XL-TOPO® vector. Směs byla inkubována 5 min při pokojové teplotě. Poté byla reakce zastavena přidáním 1 µl zastavovací soli 6X TOPO® Cloning Stop a uchována na ledu. Těsně před transformací byla ligační směs smíchána s 14 µl elektrokompetentních bakterií *E. coli* a krátkou chvíli ponechána na ledu. Poté byly bakterie transformovány elektroporací při napětí 330 V. Transformované bakterie byly přeneseny do 250 µl S.O.C. média a resuspendovány. Bakterie byly v S.O.C. mediu inkubovány 1 hodinu při 37 °C za stálého třepání (175 rpm). Následně byla suspenze transformovaných bakterií nanesena na čtvercovou kultivační misku s tuhým 2YT médiem doplněným o kanamycin (0,05 mg/ml média). Bakterie byly inkubovány v termostatu při 37 °C přes noc. V případě klonování dlouhých PCR produktů (> 200 bp) byla další den pomocí PCR se specifickými primery ověřena přítomnost klonovaného lokusu a produkty žádané velikosti byly použity pro sekvenování. V případě kratších produktů (< 200 bp) byly po inkubaci bakteriální kolonie přeočkovány na nové médium a opět kultivovány v termostatu při 37 °C do dalšího dne za účelem zisku většího množství bakterií. Poté bylo

provedeno ověření přítomnosti žádaného úseku DNA a z pozitivních kolonií byl izolován plasmid nesoucí tento úsek.

Izolace plasmidu

Pozitivní kolonie nesoucí žádaný úsek DNA byly přeneseny do 3 ml tekutého LB média s přidavkem kanamycinu (0,05 mg/ml média) a inkubovány za stálého třepání (250 rpm) přes noc. Následující den byly zkumavky s bakteriální suspenzí, centrifugovány 10 min při 3100 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 100 μ l resuspenzačního pufru P1, zároveň byl přidán 1 μ l RNázy (30 mg/ml). Celý objem suspenze byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky, bylo k němu přidáno 100 μ l lyzačního pufru P2 a po 5 minutové inkubaci při pokojové teplotě bylo přidáno 100 μ l vychlazeného neutralizačního pufru P3. Směs byla inkubována 10 min na ledu a poté centrifugována 10 min při 9300 g. 110 μ l lyzátu z jednotlivých vzorků bylo přeneseno do 96-jamkové misky a přečištěno za použití kitu Agencourt[®] CosMCPrep. Postup přečištění byl oproti manuálu mírně modifikován. K lyzátu bylo přidáno 10 μ l suspenze magnetických kuliček a 80 μ l izopropanolu. Po inkubaci byly magnetické kuličky s navázanou DNA imobilizovány pomocí magnetu na stěnách zkumavek a supernatant byl odpipetován. Poté byly kuličky dvakrát opláchnuty 100 μ l 80% ethanolu. Po odebrání veškerého roztoku byly vzorky vysušeny od zbytků ethanolu při 37 °C. K vysušeným kuličkám s navázanou DNA bylo přidáno 40 μ l deionizované vody, aby došlo k eluci DNA. Po 5 minutách byla miska umístěna na magnet a po vyčeření byl roztok eluované DNA přenesen do nové misky.

Purifikace PCR produktu před sekvenováním

Produkty PCR a byly před sekvenační reakcí přečištěny směsí enzymů exonukleázy I a termosenzitivní alkalické fosfatázy za účelem odstranění zbytků nukleotidů a primerů, které by interferovaly s vlastní sekvenační reakcí. Purifikační reakce probíhala v celkovém objemu 7 μ l, což poskytovalo dostatečné množství DNA pro 2 následné sekvenační reakce (sekvenování úseku DNA z obou konců). K 3 μ l PCR produktu bylo přidáno 0,05 μ l exonukleázy I (20 U/ μ l), 0,5 μ l termosenzitivní alkalické fosfatázy FastAP (1 U/ μ l) a 3,45 μ l 1x PCR pufru. Reakční směs byla inkubována v termocycleru 30 min při 37 °C a následně 5 min při 95 °C.

Sekvenování

Sekvenování bylo prováděno s použitím sekvenačního kitu BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Sekvenační reakce probíhala v objemu 10 µl podle instrukcí uváděných v kitu. Reakční směs obsahovala sekvenační směs BigDye, 5x sekvenační pufr, specifický primer či primer komplementární k sekvenci plasmidu, deionizovanou vodu a purifikovanou DNA (tab. 14). Množství DNA bylo optimalizováno na objem 2 µl na reakci. Reakce probíhala v termocycleru za podmínek uvedených v tabulce 15. Produkty sekvenační reakce byly přečištěny kitem Agencourt CleanSEQ. Před vložením do sekvenátoru byly vzorky denaturovány 2 min při teplotě 98 °C. Analýza sekvenačních produktů byla prováděna na 96-kapilárovém sekvenátoru. Výsledky byly zpracovány pomocí programů Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems) a MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

Tab. 14: Složení reakční směsi pro sekvenování

Reagencie	Objem
BigDye	1 µl
5x sekvenační pufr	1,5 µl
10 µM primer	1 µl
Purifikovaná DNA	2 µl
Deionizovaná H ₂ O	4,5 µl
Celkový objem	10 µl

Tab. 15: Podmínky sekvenační reakce

	Teplota	Čas
	98 °C	5 min
50x	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	4 min

5. Výsledky

5.1 Metody pro analýzu genotypu za pomoci mikrosatelitových markerů

Byly testovány tři metody vhodné k analýze genotypu mikrosatelitových markerů. Jednalo se o kapilární elektroforézu, elektroforézu v nedenaturujícím PAA gelu a elektroforézu v denaturujícím PAA gelu. Pro testování těchto metod byla použita jednak DNA rodičů mapovací populace (A a B), izolovaná kitem Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit, a směs DNA rodičů v poměru 1:1, představující genotyp heterozygota (H). Dále byla použita DNA jedinců mapovací populace F_{2,3}, která byla izolována komerčním kitem Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit nebo metodou vysokokapacitní izolace DNA za použití kitu Agencourt[®] Genfind v2. Získané výsledky byly vzájemně porovnány a použité metody byly ohodnoceny z hlediska vhodnosti použití k analýze genotypu jedinců mapovací populace pro markery ve vazbě na gen pro rezistenci k mšici zhoubné (*cfid14*, *cfid68*, *gwm473*).

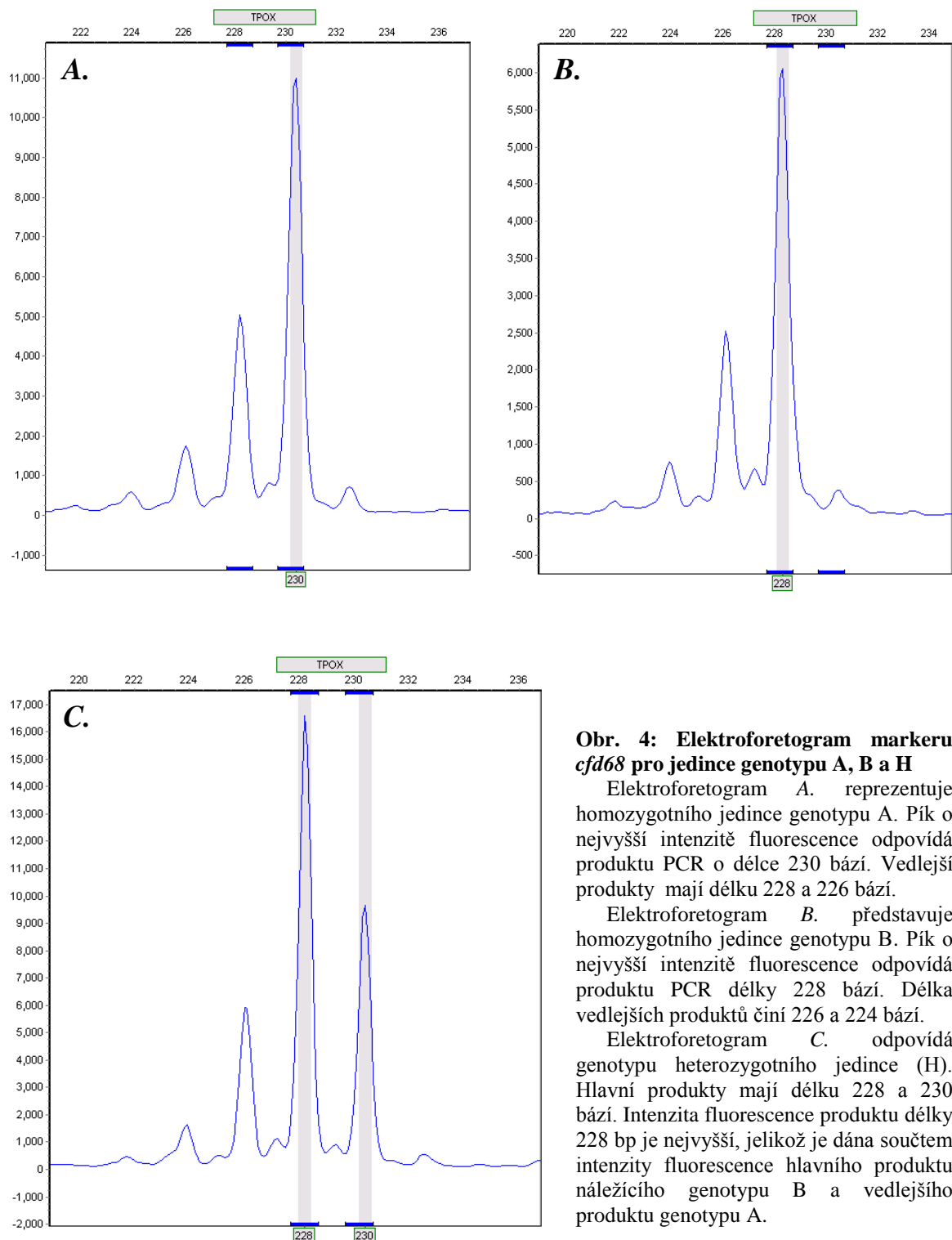
5.1.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza byla použita k zjištění genotypu jedinců mapovací populace v lokusech *cfid68* a *gwm473*. Touto metodou byli analyzováni jedinci, jejichž DNA byla izolována vysokokapacitní metodou. Jako pozitivní kontrola k určení jednotlivých genotypů sloužili rodiče mapovací populace. Celkově bylo analyzováno 552 jedinců mapovací populace.

Polymorfní PCR produkty markeru *cfid68* mají velikost 209 a 211 bp. V případě markeru *gwm473* jsou polymorfní produkty PCR dlouhé 225 a 227 bp. Pro detekci produktů PCR při kapilární elektroforéze bylo použito fluorescenční značení za pomoci prodlouženého primeru Fext a značeného primeru M13 6-FAM. V důsledku toho byly tyto produkty PCR oproti původním velikostem delší o 19 bp. Hodnoceny tedy byly polymorfní produkty délek 228 a 230 bází v případě markeru *cfid68* a 244 a 246 bází v případě markeru *gwm473*. Výstupem z kapilární elektroforézy je elektroforetogram, který je tvořen píky intenzity fluorescence, které odpovídají produktům určité délky. Velikost produktů je stanovena porovnáním s fluorescenčně značeným velikostním standardem, který je přítomen v každém vzorku.

V případě homozygotního genotypu byl na elektroforetogramu přítomen jeden hlavní (nejvyšší) pík, odpovídající hlavnímu produktu PCR, a jeden či více menších píků, tzv. *stutter* píků, které představují vedlejší produkty reakce. Pokud je zkoumaný jedinec

heterozygot (H), měly by u něj být přítomny produkty PCR charakteristické pro genotyp A i B ve stejném poměru, včetně vedlejších produktů reakce. Výsledné intenzity fluorescence produktů o shodných délkách se pak sčítají. Obrázky 4 a 5 znázorňují elektroforetogramy produktů PCR pro rodiče mapovací populace (A a B) a heterozygota (H) při použití primerů amplifikujících mikrosatelitové lokusy *cf68* a *gwm473*.

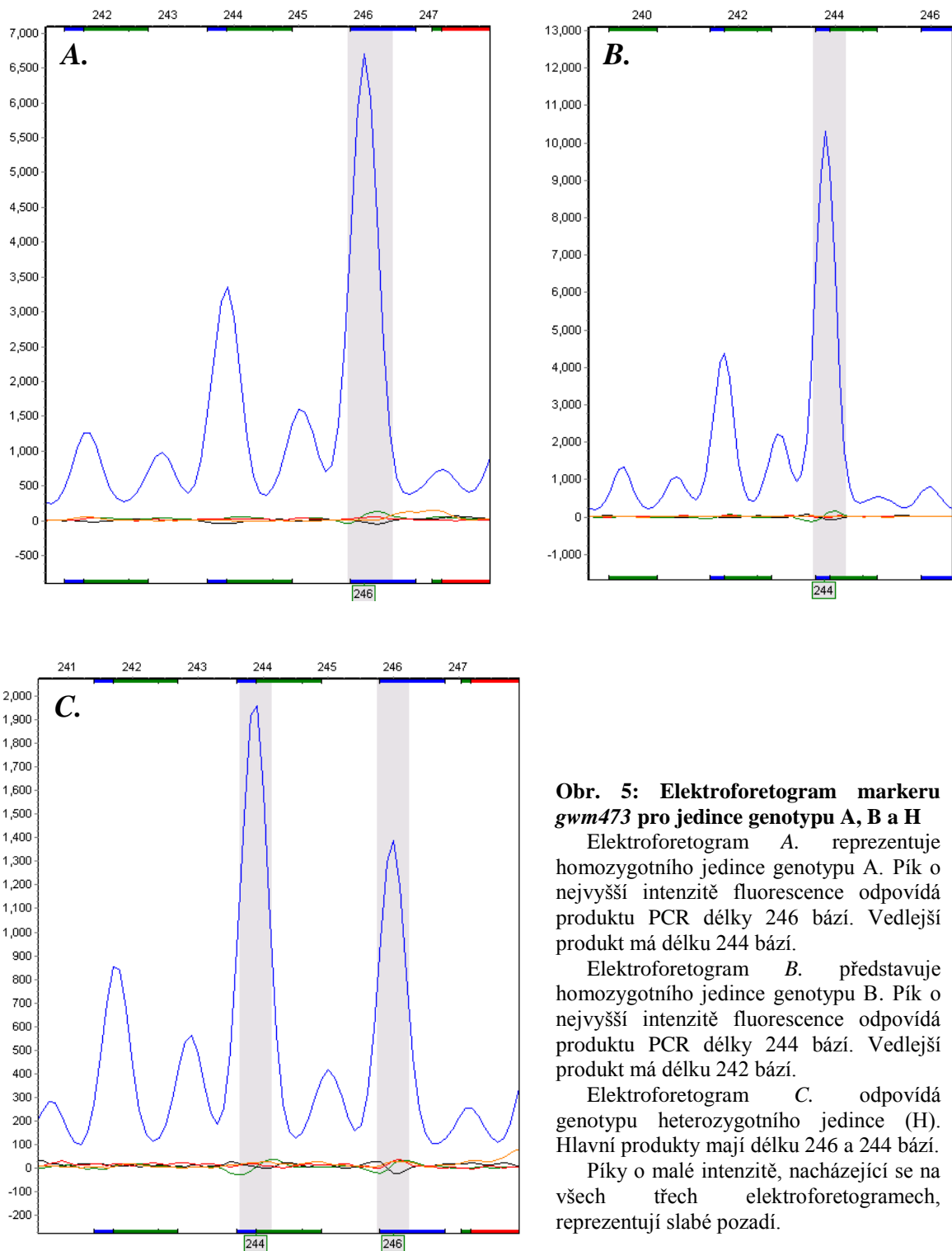


Obr. 4: Elektroforetogram markeru *cf68* pro jedince genotypu A, B a H

Elektroforetogram A. reprezentuje homozygotního jedince genotypu A. Pík o nejvyšší intenzitě fluorescence odpovídá produktu PCR o délce 230 bází. Vedlejší produkty mají délku 228 a 226 bází.

Elektroforetogram B. představuje homozygotního jedince genotypu B. Pík o nejvyšší intenzitě fluorescence odpovídá produktu PCR délky 228 bází. Délka vedlejších produktů činí 226 a 224 bází.

Elektroforetogram C. odpovídá genotypu heterozygotního jedince (H). Hlavní produkty mají délku 228 a 230 bází. Intenzita fluorescence produktu délky 228 bp je nejvyšší, jelikož je dána součtem intenzity fluorescence hlavního produktu náležícího genotypu B a vedlejšího produktu genotypu A.



Obr. 5: Elektroforetogram markeru *gwm473* pro jedince genotypu A, B a H

Elektroforetogram A. reprezentuje homozygotního jedince genotypu A. Pík o nejvyšší intenzitě fluorescence odpovídá produktu PCR délky 246 bází. Vedlejší produkt má délku 244 bází.

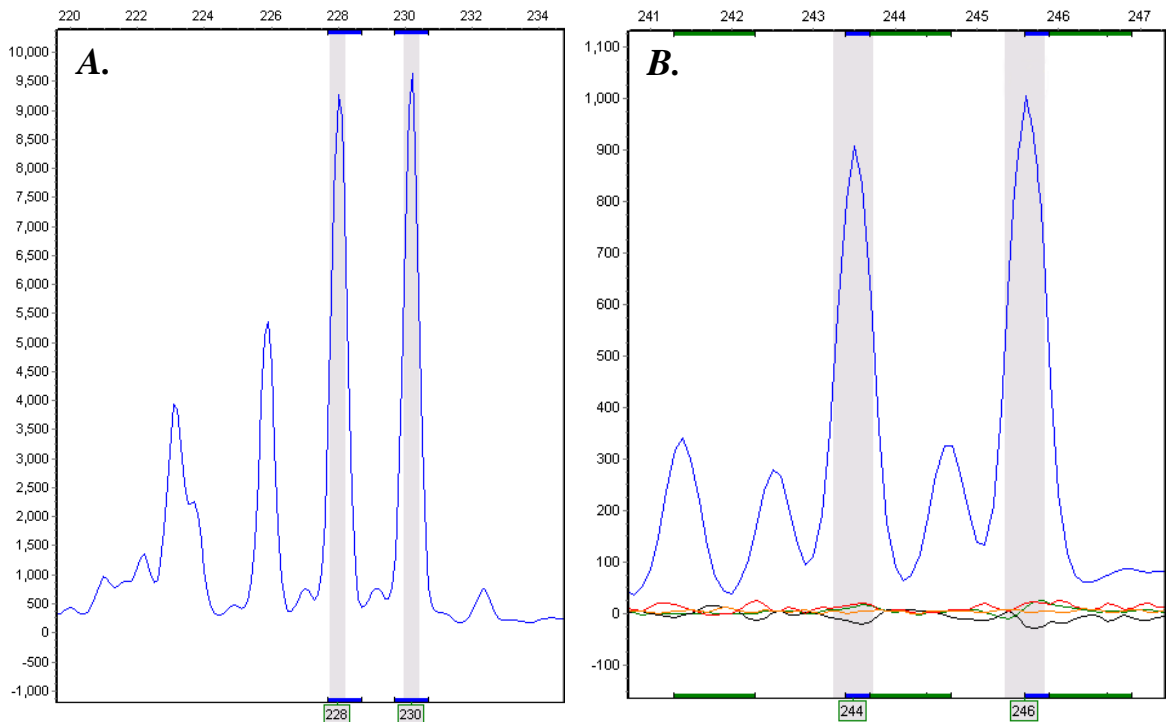
Elektroforetogram B. představuje homozygotního jedince genotypu B. Pík o nejvyšší intenzitě fluorescence odpovídá produktu PCR délky 244 bází. Vedlejší produkt má délku 242 bází.

Elektroforetogram C. odpovídá genotypu heterozygotního jedince (H). Hlavní produkty mají délku 246 a 244 bází.

Píky o malé intenzitě, nacházející se na všech třech elektroforetogramech, reprezentují slabé pozadí.

Obrázky 4 a 5 představují výsledky, které jsou velmi dobře hodnotitelné. Takovéhoto výsledků bylo dosaženo při použití DNA izolované kitem Invisorb® Spin Plant Mini Kit. Pokud však byla použita DNA izolovaná vysokokapacitní metodou, byly některé vzorky hodnotitelné obtížně. Příkladem takového výsledku je obrázek 6. Z tohoto elektroforetogramu není jasné, zda se jedná o genotyp A či H. Získaný výsledek by bylo

možno interpretovat jako genotyp A, protože nejvyšší intenzitu fluorescence vykazuje PCR produkt velikosti 230 respektive 246 bází. Intenzita fluorescence produktu PCR velikosti 228 respektive 244 bází je však příliš vysoká, takže se zřejmě nejedná o vedlejší produkt reakce (*stutter* pík), ale jeden z hlavních produktů. Zkoumaný jedinec je tedy zřejmě heterozygotního genotypu. Takovýto výsledek by mohl nasvědčovat kontaminaci DNA heterozygota jedincem genotypu A.

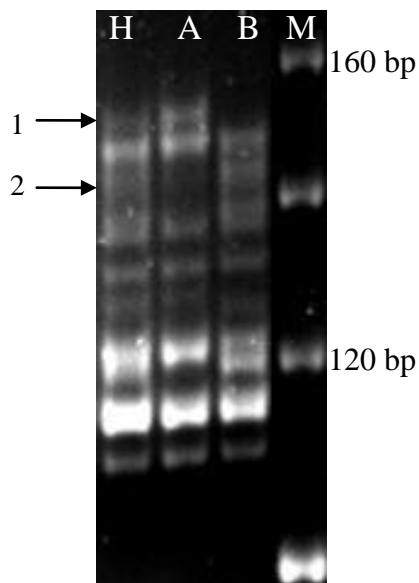


Obr. 6: Elektroforetogram markeru *cfd68* a *gwm473* pro jedince s nejednoznačným genotypem

Elektroforetogram A. odpovídá markeru *cfd68*, elektroforetogram B. markeru *gwm473*. Na obou elektroforetogramech je možno vidět dva hlavní píky, odpovídající produktům velikosti 228 a 230 bází v případě markeru *cfd68* a 244 a 246 bází v případě markeru *gwm473*. Nejvyšší intenzitu fluorescence mají v případě obou markerů nejdelší produkty (230 bází, 246 bází), které jsou charakteristické pro genotyp A. Intenzita fluorescence produktů délky 228 a 244 bází je příliš vysoká na to, aby byly označeny za vedlejší produkty reakce. S největší pravděpodobností se jedná o vzorek DNA jedince genotypu H, který byl kontaminován vzorkem genotypu A.

5.1.2 Elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu

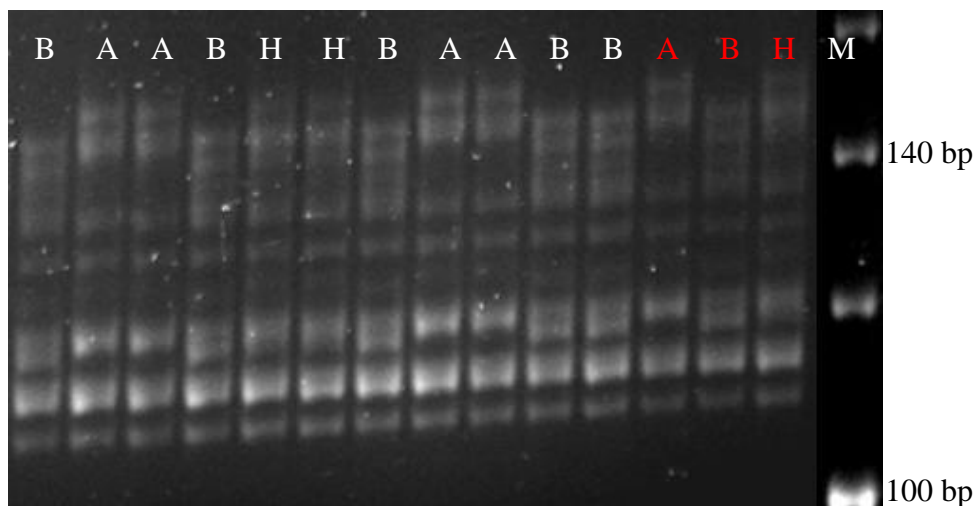
Elektroforézou v nedenaturujícím PAA gelu byly analyzovány pouze produkty PCR markeru *cfd14*. Polymorfní produkty zbývajících dvou markerů (*cfd68* a *gwm473*) nebyly na tomto elektroforetickém systému rozlišitelné. Alely markeru *cfd14* jsou znázorněny na obrázku 7.



Obr. 7: Elektroforetogram markeru *cfd14* na nenedenaturujícím PAA gelu pro rodiče a heterozygota

Šipky vyznačují polymorfní PCR produkty. Šipka 1 označuje produkt typický pro genotyp B, šipka 2 produkt genotypu A. U heterozygota jsou patrné oba dva produkty. Písmena A, B, H značí genotypy analyzovaných jedinců. M – velikostní marker 20 bp ladder.

Původně byl pozorován a vyhodnocován pouze polymorfismus v produktu PCR č. 1, což umožnilo jednoznačně rozlišit pouze genotyp recesivního homozygota (B), zatímco genotyp dominantního homozygota (A) a heterozygota (H) byly považovány za nerozlišitelné a byly souhrnně označovány písmenem D. Marker byl skórován jako dominantní. Na obrázku 7 a 8 je však možno pozorovat produkt PCR č. 2 charakteristický pro dominantního homozygota (A). Na základě těchto snímků je od sebe možné rozlišit všechny 3 genotypy a marker *cfd14* tak může být skórován jako kodominantní. Rozlišení mezi genotypem A a H však není dostatečně spolehlivé pro analýzu genotypu ve velkém měřítku, vzhledem k nereprodukovatelnosti výsledků.



Obr. 8: Elektroforetogram markeru *cfd14* na nenedenaturujícím PAA gelu pro jedince mapovací populace

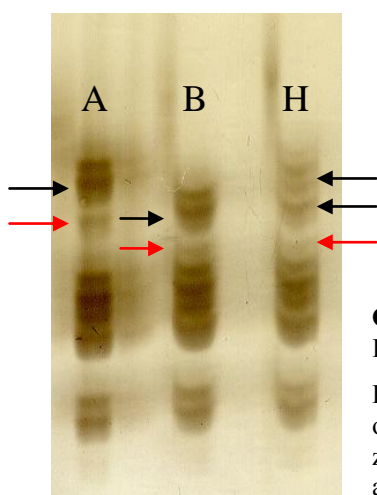
Písmena A, B a H označují zjištěné genotypy pro analyzovaný marker. Bílá písmena reprezentují jedince mapovací populace, červeně jsou označeni rodiče a heterozygot, kteří byli použiti jako kontroly. M – velikostní marker 20 bp ladder.

5.1.3 Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu

Touto metodou byly testovány všechny tři mikrosatelitové markery. Nejprve byla prováděna PCR při teplotě nasedání primerů (T_a), která byla uvedena pro dané markery v databázi GrainGenes 2.0, s následnou separací na 6% denaturujícím PAA gelu. Poté byla T_a u jednotlivých markerů optimalizována, aby bylo dosaženo co nejvyššího rozlišení alel polymorfních lokusů. Teplota nasedání primerů byla v první fázi optimalizována s použitím DNA izolované kitem Invisorb® Spin Plant Mini Kit. Následně byla provedena optimalizace pro DNA získanou vysokokapacitní izolací. Po zjištění optimálních T_a pro rodiče bylo otestováno 24 jedinců mapovací populace, u kterých byl již předtím určen genotyp na základě kapilární elektroforézy (*cf_d68* a *gwm473*), nebo elektroforézy v nedenaturujícím PAA gelu (*cf_d14*).

Marker *cf_d14*

S použitím primerů pro marker *cf_d14* došlo k amplifikaci několika lokusů, z nichž pouze jeden byl na denaturujícím PAA gelu vyhodnocen jako polymorfní (obr. 9). Teplota nasedání primerů (T_a) byla postupně zvyšována po dvou stupních od 55 °C až po 70 °C. Alely polymorfního lokusu byly u rodičů a vzorků jedinců populace, jejichž DNA byla izolována kitem, rozlišitelné již při T_a 55 °C. Zvyšováním T_a nebylo dosaženo výraznější redukce pozadí. Kromě hlavního produktu byl přítomen jeden *stutter band*, který však byl slabší, a tak nebránil rozlišení jednotlivých alel a určení genotypu (obr. 9).

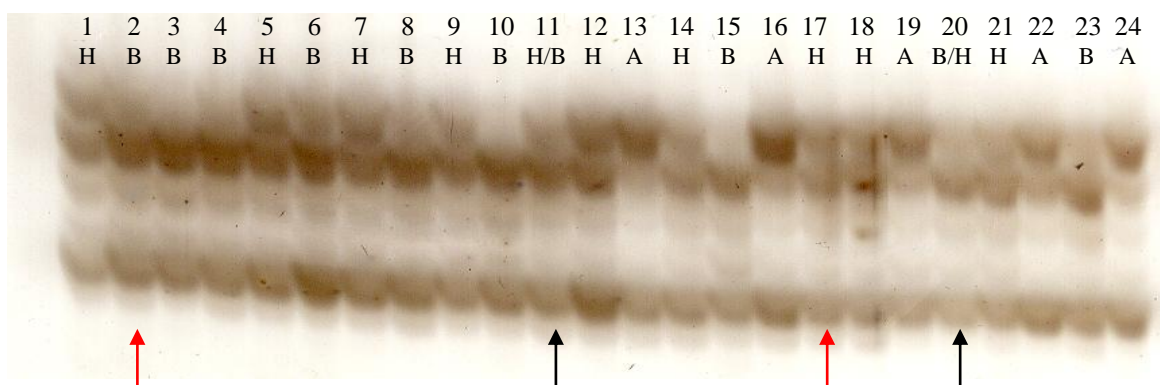


Obr. 9: Elektroforetogram markeru *cf_d14* na denaturujícím PAA gelu pro rodiče a heterozygota

PCR amplifikace byla provedena při T_a 55 °C. Černé šipky označují jednotlivé alely polymorfního lokusu. Červené šipky znázorňují *stutter bandy*. Písmena A, B, H značí genotypy analyzovaných jedinců.

Při testování vzorku DNA jedinců mapovací populace, která byla izolována vysokokapacitní metodou, byla T_a zvýšena až na 64 °C. Výsledky byly hůře hodnotitelné

než v případě DNA rodičů, protože v některých případech byl *stutter band* natolik silný, že jej bylo možno zaměnit za hlavní produkt. Zvyšováním T_a nebylo možné redukovat přítomnost nespecifických produktů, protože při vyšších teplotách (66 – 70 °C) byly produkty PCR velmi slabé a nehodnotitelné. Obrázek 10 znázorňuje výsledek genotypování 24 náhodně vybraných jedinců mapovací populace, jejichž genotyp byl dříve určen pomocí nedenaturující PAA elektroforézy.



Obr. 10: Elektroforetogram markeru *cfd14* na denaturujícím PAA gelu pro jedince mapovací populace

PCR byla provedena při T_a 64 °C. Použitá DNA byla izolována vysokokapacitní metodou. Na gelu jsou viditelné všechny tři typy genotypů (A, B, H), v některých případech nejsou výsledky jednoznačné (značeny černou šipkou). Vzorky s odlišným výsledkem oproti analýze na nedenaturujícím PAA gelu jsou označeny červenou šipkou.

V tabulce 16 jsou pak shrnuty genotypy určené pomocí nedenaturující a denaturující PAA elektroforézy. Genotypy, které nebylo možno jednoznačně určit, jsou zvýrazněny šedou barvou. Ty, které se u použitých dvou metod liší, jsou zvýrazněny červeně.

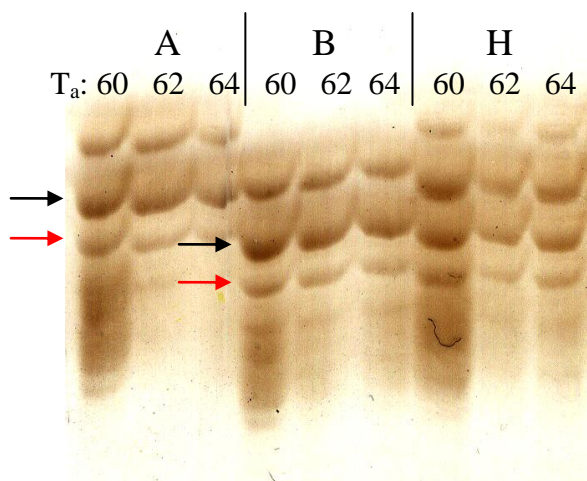
Tab. 16: Srovnání genotypu jedinců mapovací populace pro marker *cfd14* zjištěného separací na denaturujícím a nedenaturujícím PAA gelu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Denaturující PAA gel	H	B	B	B	H	B	H	B	H	B	H/B	H
Nedenaturující PAA gel	D	D	B	B	D	B	D	B	D	B	D	D
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Denaturující PAA gel	A	H	B	A	H	H	A	B/H	H	A	B	A
Nedenaturující PAA gel	D	D	B	D	B	D	D	D	D	D	B	D

Písmeno D označuje genotyp A či H.

Marker *cf_d68*

V případě markeru *cf_d68* došlo k amplifikaci jediného lokusu, který je zároveň polymorfní mezi rodiči mapovací populace a je ve vazbě s genem *Dn_{CI2401}*. Na elektroforetickém gelu (obr. 11) je možno pozorovat polymorfní produkty PCR daného lokusu. Teplota nasedání primerů pro tento marker byla testována v rozmezí 60 – 68 °C. Při teplotě 68 °C již nedošlo k amplifikaci produktu PCR. Optimální T_a při použití DNA izolované oběma metodami byla 64 °C. Obrázek 11 znázorňuje optimalizaci T_a s použitím DNA rodičů mapovací populace. Se zvyšující se teplotou dochází ke snižování intenzity pozadí. Kromě hlavních produktů je přítomen také slabší *stutter band*.

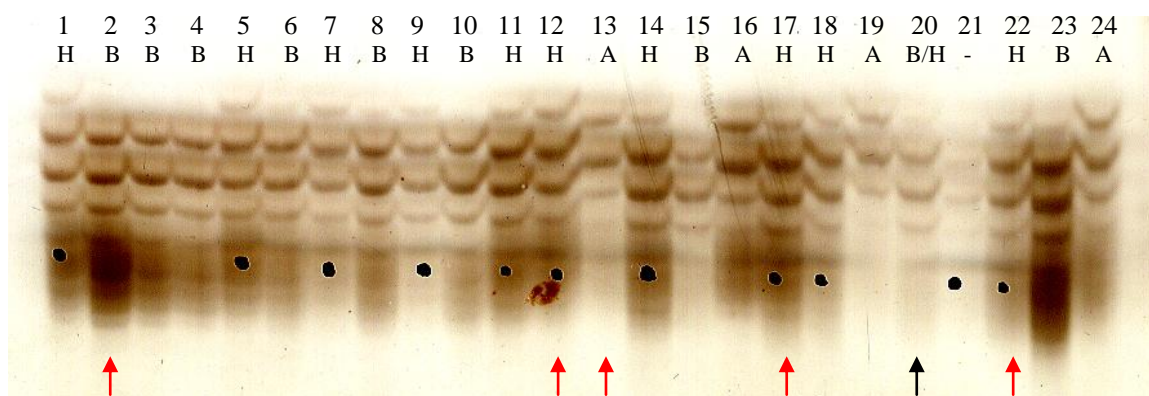


Obr. 11: Elektroforetogram markeru *cf_d68* na denaturujícím PAA gelu pro rodiče a heterozygota při optimalizaci T_a

PCR byla provedena při $T_a = 60, 62$ a 64 °C s použitím DNA rodičů mapovací populace. Se zvyšováním T_a je patrné snižování intenzity pozadí.

Černé šipky označují polymorfní produkty PCR. Červené označují vedlejší produkt PCR reakce – *stutter band*. Písmena A, B, H značí genotypy analyzovaných jedinců.

Při optimální teplotě 64 °C byly genotypováno 24 vzorků z mapovací populace. Na elektroforetickém gelu byly identifikovány všechny tři genotypy (obr. 12). Hodnocení bylo komplikováno různou intenzitou *stutter bandů* a dále různou koncentrací použité DNA. Některé vzorky byly po obarvení příliš intenzivní a měly výrazné pozadí, jiné byly příliš slabé až nehodnotitelné (vzorek 21).



Obr. 12: Elektroforetogram markeru *cfd68* na denaturujícím PAA gelu pro jedince mapovací populace

PCR byla provedena při T_a 64 °C. Použitá DNA byla izolována vysokokapacitní metodou. Na gelu jsou viditelné všechny tři genotypy (A, B, H). Červené šipky označují vzorky, u nichž byl určen jiný genotyp než při použití kapilární elektroforézy. Černá šipka označuje vzorek, u něž nebylo možno zcela jednoznačně určit genotyp.

Porovnání genotypů zjištěných elektroforézou v denaturujícím PAA gelu a kapilární elektroforézou je uvedeno v tabulce 17. Červeně jsou označeny vzorky, u nichž byly zjištěny rozdílné výsledky. Šedou barvou je označen vzorek, u něž nebylo možné jednoznačně určit genotyp.

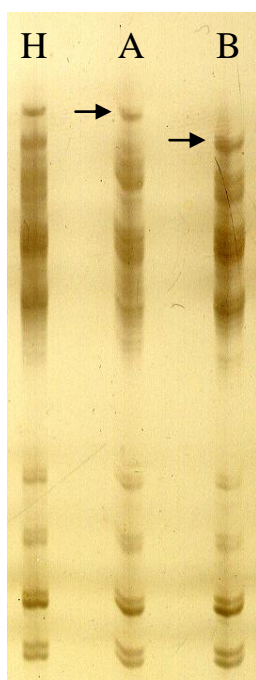
Tab. 17: Srovnání genotypů jedinců mapovací populace pro marker *cfd68* zjištěných separací na denaturujícím PAA gelu a kapilární elektroforéze

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Denaturující PAA gel	H	B	B	B	H	B	H	B	H	B	H	H
Kapilární elektroforéza	H	H	B	B	H	B	H	B	H	B	H	A
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Denaturující PAA gel	A	H	B	A	H	H	A	B/H	-	H	B	A
Kapilární elektroforéza	H	H	B	A	B	H	A	H	H	A	B	A

Marker *gwm473*

S použitím primerů pro marker *gwm473* bylo amplifikováno několik lokusů, z nichž jeden vykazoval polymorfismus ve vazbě s genem *Dn_{CI2401}*. Teplota nasedání primerů byla testována v rozmezí 48 – 57 °C. Pro PCR s DNA rodičů byla optimální teplota stanovena na 55 °C. V případě, kdy byla jako templát PCR použita DNA izolovaná kitem Invisorb® Spin Plant Mini Kit, bylo možno rozlišit jednotlivé alely polymorfního lokusu i přesto, že byla přítomna určitá úroveň pozadí (obr. 13). Při použití DNA jedinců mapovací populace, která byla izolována vysokokapacitní metodou, byly výsledky

nehodnotitelné. Pozadí bylo natolik silné i po optimalizaci T_a , že nebylo možno rozeznat jednotlivé alely (obr. 14).



Obr. 13: Elektroforetogram markeru *gwm473* na denaturujícím PAA gelu pro rodiče a heterozygota

PCR amplifikace byla provedena při T_a 55 °C. Černé šipky označují jednotlivé alely polymorfního lokusu. Písmena A, B, H značí genotypy analyzovaných jedinců.



Obr. 14: Elektroforetogram markeru *gwm473* na denaturujícím PAA gelu pro jedince mapovací populace

PCR probíhala při T_a 55 °C. Alely polymorfního lokusu nebylo možné rozlišit z důvodu přítomnosti silného pozadí.

5.2 Testování nových markerů

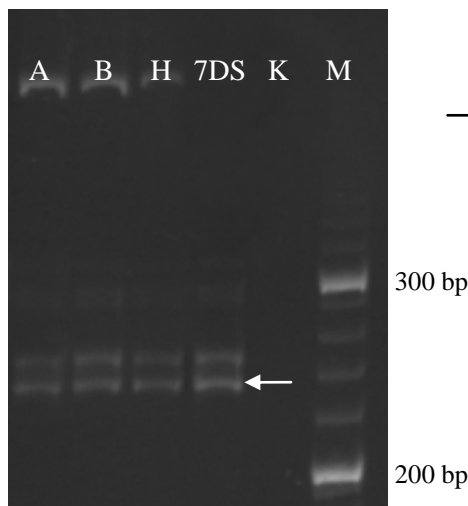
Celkově bylo na polymorfismus mezi rodiči mapovací populace otestováno 52 potenciálních markerů, z toho 14 mikrosatelitových (SSR) markerů, 33 markerů ISBP a 5 markerů IRAP. Markery byly analyzovány pomocí elektroforézy v denaturujícím i nedenaturujícím PAA gelu a sekvenování.

5.2.1 Mikrosatelitové (SSR) markery

Produkty PCR s DNA rodičů (A, B, H) a amplifikovanou DNA krátkého ramene chromozómu 7D, která sloužila jako pozitivní kontrola k identifikaci produktu specifického pro 7DS, byly separovány na 6% nedenaturujícím PAA gelu. K amplifikaci specifického produktu došlo u všech mikrosatelitových markerů kromě markeru *MS 14*, u něhož byla na gelu patrná pouze šmouha. Mezi amplifikovanými produkty markerů *MS1* – *MS13* se vždy nacházel produkt specifický pro krátké rameno chromozómu 7D.

Pozorované délky produktů odpovídaly délkám předpokládaným na základě sekvence, z níž byly příslušné primery odvozeny. Pouze v případě markeru *MS 7* došlo k amplifikaci dvou produktů o přibližné délce 75 a 80 bp, přičemž předpokládaná délka činila 247 bp. Po separaci na 6% nedenaturujícím PAA gelu se většina markerů jevila jako monomorfní.

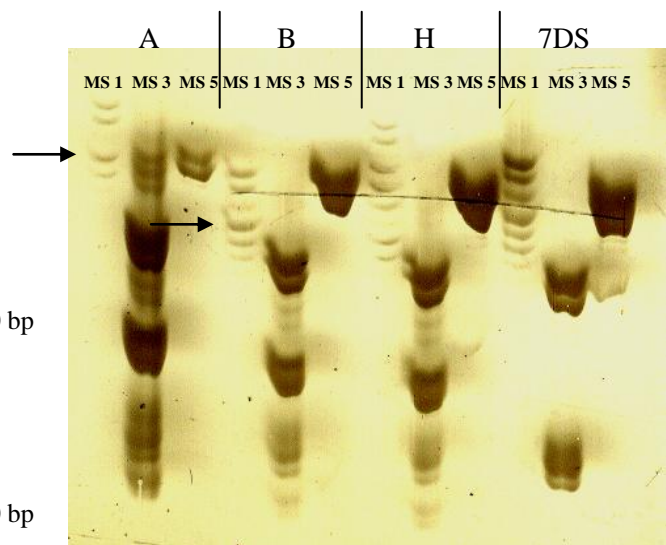
Markery, u nichž byla délka motivu 2 a 3 bp, byly po proběhnutí nedenaturující PAA elektroforézy otestovány na denaturujícím 6% PAA gelu. Polymorfismus byl prokázán pouze u jednoho z markerů, a to markeru *MS 1* (viz obr. 15 a 16). Primery pro tento marker byly navrženy do okolí mikrosatelitového lokusu, který je základem polymorfního markeru *cfid68*.



Obr. 15: Elektroforetogram markeru *MS 1* na nedenaturujícím 6% PAA gelu

PCR byla provedena s DNA rodičů mapovací populace (A, B, H) a amplifikovanou DNA z tříděného krátkého ramene chromozómu 7D (7DS). Šipka označuje produkt PCR specifický pro krátké rameno chromozómu 7D. Na 6% nedenaturujícím PAA gelu se marker *MS 1* jeví jako monomorfní.

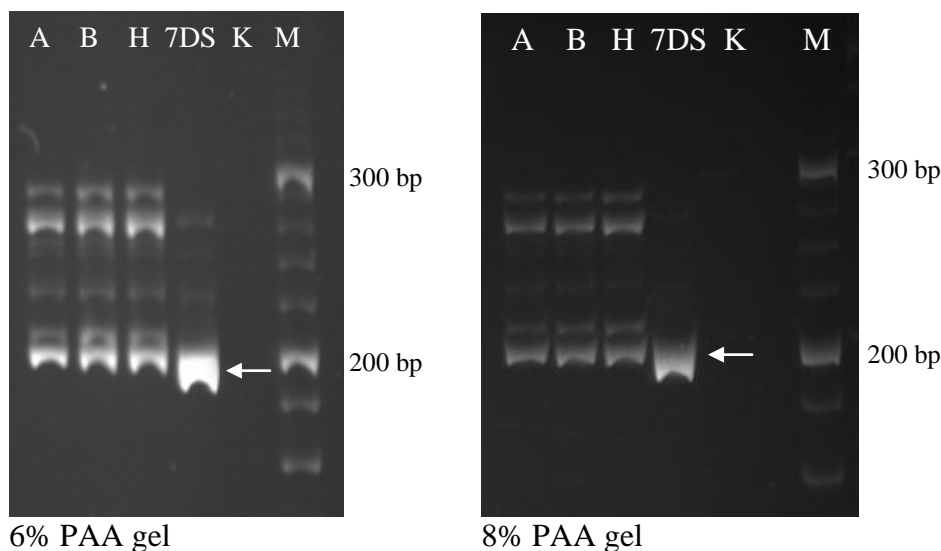
K – negativní kontrola, M – velikostní marker 20 bp ladder.



Obr. 16: Elektroforetogram markerů *MS 1*, *MS 3* a *MS 5* na denaturujícím PAA gelu

PCR byla provedena s DNA rodičů mapovací populace (A, B, H) a amplifikovanou DNA z tříděného krátkého ramene chromozómu 7D (7DS). Marker *MS 1* vykazuje polymorfismus mezi rodiči mapovací populace. Polymorfní produkty PCR jsou označeny šipkou. Markery *MS 3* a *MS 5* jsou monomorfní.

Markery s délkou repetitivního motivu 4 a 5 bp byly pro potvrzení výsledku znovu testovány na 8% nedenaturujícím PAA gelu (obr. 17). Žádný z markerů nevykazoval polymorfismus.



Obr. 17: Elektroforetogram markeru *MS 11* na 6% a 8% nedenaturujícím PAA gelu

PCR byla provedena s DNA rodičů mapovací populace (A, B, H) a amplifikovanou DNA z tříděného krátkého ramene chromozómu 7D (7DS). Šipka označuje produkt PCR specifický pro krátké rameno chromozómu 7D. Polymorfismus není patrný ani na jednom z gelů.

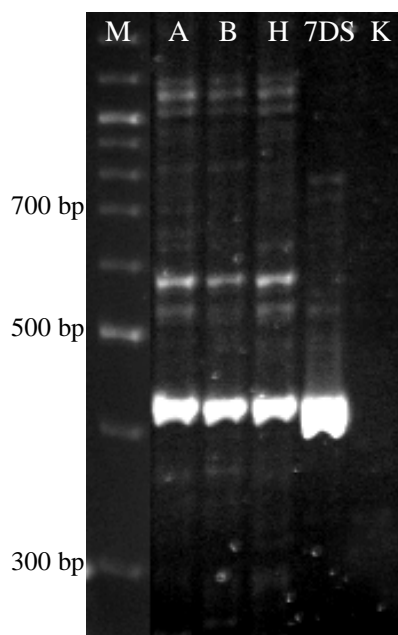
K – negativní kontrola, M – velikostní marker 20 bp ladder.

5.2.2 Markery ISBP

Testované ISBP markery byly rozděleny do dvou skupin. První skupina obsahovala markery odvozené z kompletních sekvencí čtyř BAC klonů, které byly získány metodou 454 sekvenování. Druhou skupinu tvořily markery odvozené ze sekvencí konců BAC klonů (BES). Polymorfismus byl testován za pomoci PCR s následnou separací produktů v 4% nedenaturujícím PAA gelu. PCR probíhala za podmínek specifických pro příslušné primery. Templátem byla DNA rodičů (A, B, H) a amplifikovaná DNA krátkého ramene chromozómu 7D (7DS), která sloužila jako pozitivní kontrola k identifikaci produktu specifického pro 7DS. U markerů odvozených z BES byl zjišťován polymorfismus také na sekvenční úrovni.

Markery odvozené z kompletních sekvencí BAC klonů byly navrženy za pomoci programu *ISBPFinder*. Tyto markery byly testovány na polymorfismus typu přítomnosti nebo nepřítomnosti produktu. Markery odvozené z celých BAC klonů poskytovaly při

doporučené T_a větší počet produktů PCR (obr. 18). Produkt specifický pro krátké rameno chromozómu 7D byl identifikován srovnáním s pozitivní kontrolou a na základě délky odpovídající sekvenci, z níž byl marker odvozen. Žádný z testovaných markerů nevykazoval polymorfismus u produktů specifických pro krátké rameno chromozómu 7D. Produkt pocházející ze 7DS byl vždy přítomen u obou rodičů i u heterozygota. Markery *ISBP 15* a *ISBP 22* poskytovaly jen jeden produkt, který byl současně specifický pro 7DS.



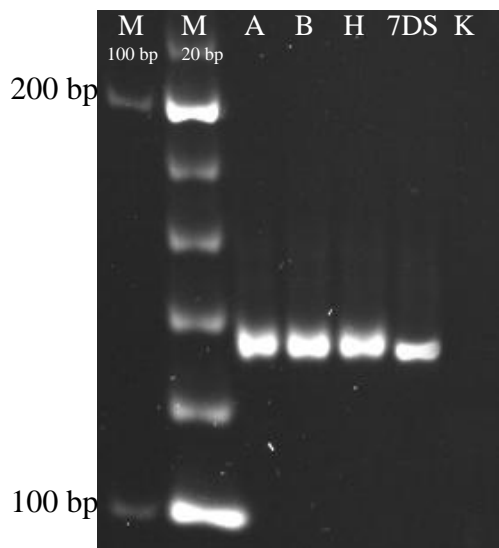
Obr. 18: Elektroforetogram markerů *ISBP 2* na 4% nedenaturujícím PAA gelu

PCR byla provedena s DNA rodičů mapovací populace (A, B, H) a amplifikovanou DNA z tříděného krátkého ramene chromozómu 7D (7DS). Primery markeru *ISBP 2* amplifikovaly více produktů PCR, z nichž jeden byl specifický pro 7DS.

M – velikostní marker 100 bp ladder, K – negativní kontrola.

U markeru *ISBP 7* nedošlo k amplifikaci DNA rodičů, bylo přítomno pouze několik produktů specifických pro krátké rameno chromozómu 7D, z nichž jeden odpovídal předpokládané velikosti. Zbylé markery poskytovaly 2 a více produktů PCR, z nichž minimálně 1 byl 7DS specifický. Tento specifický produkt odpovídal předpokládané velikosti produktu.

Markery odvozené ze sekvencí konců BAC klonů (BES) byly navrženy manuálně. Ze všech jedenácti markerů (*ISBP 23* – *ISBP 33*) nedošlo k amplifikaci DNA rodičů mapovací populace pouze u markeru *ISBP 30*. U zbylých markerů byl přítomen jeden nebo více produktů. Žádný z markerů nevykazoval polymorfismus typu přítomnost/nepřítomnost produktu mezi rodiči A a B. Proto byly markery, jejichž primery amplifikovaly pouze jeden produkt (obr. 19), vybrány pro osekvenování a zjištění případného polymorfismu na sekvenční úrovni.



Obr. 19: Elektroforetogram markeru *ISBP 23* na 4% nedenaturujícím PAA gelu

PCR byla provedena s DNA rodičů mapovací populace (A, B, H) a amplifikovanou DNA z tříděného krátkého ramene chromozómu 7D (7DS). Na DNA rodičů došlo k amplifikaci jednoho produktu, který je specifický pro 7DS. Marker *ISBP 23* nevykazuje polymorfismu typu přítomnost/nepřítomnost.

M – velikostní markery 20 bp ladder a 100 bp ladder, K – negativní kontrola

Pro zaklonování a osekvenování byly vybrány produkty PCR všech markerů kromě *ISBP 25*, *ISBP 29* a *ISBP 30* (tab. 18). U markerů *ISBP 25* a *ISBP 29* bylo přítomno více produktů. V případě markeru *ISBP 30* nedošlo k amplifikaci produktu.

Tab. 18: Přehled sekvenování *ISBP* lokusů pocházejících z BES sekvencí

Označení markeru	Sekvenování	Primery pro sekvenování	Předpokládaná velikost PCR produktu (bp)
<i>ISBP 23</i>	ano	M13	134
<i>ISBP 24</i>	ano	specifické primery	207
<i>ISBP 25</i>	ne	-	335
<i>ISBP 26</i>	ano	specifické primery	498
<i>ISBP 27</i>	ano	specifické primery	619
<i>ISBP 28</i>	ano	specifické primery	680
<i>ISBP 29</i>	ne	-	267
<i>ISBP 30</i>	ne	-	85
<i>ISBP 31</i>	ano	specifické primery	217
<i>ISBP 32</i>	ano	specifické primery	295
<i>ISBP 33</i>	ano	M13	155

Klonování a sekvenování vybraných markerů

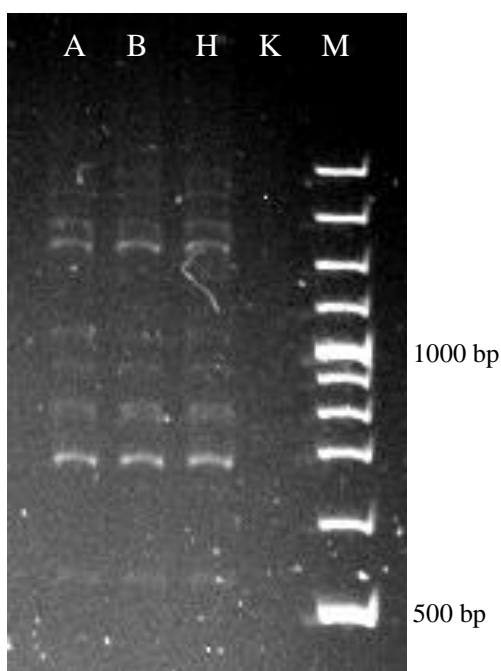
Produkty markerů *ISBP 23* a *ISBP 33* byly sekvenovány pomocí primerů M13 komplementárních k sekvenci plasmidu z důvodu jejich malé délky (134 a 155 bp). Produkty PCR zbylých markerů, jichž délka činila 207 – 680 bp, byly sekvenovány z primerů specifických pro daný marker.

U žádného ze sekvenovaných produktů nebyl prokázán polymorfismus na sekvenční úrovni mezi DNA rodičů (A a B). Ze sekvenovaných lokusů byly 4 jednoznačně

monomorfní (*ISBP 23*, *ISBP 28*, *ISBP 31*, *ISBP 32*). V případě markerů *ISBP 24*, *ISBP 26*, *ISBP 27* a *ISBP 33* byly přítomny polymorfismy na sekvenční úrovni, které se však vyskytovaly mezi produkty DNA jednoho i druhého rodiče. Polymorfní varianty se tedy nacházely u obou rodičů a rodiče díky nim nebyli rozlišitelní.

5.2.3 Markery IRAP

Bylo otestováno 5 markerů IRAP. Primery byly navrženy na základě sekvencí odvozených z konců BAC klonů. Templátem pro PCR byla DNA rodičů (A, B, H). Z pěti otestovaných markerů došlo k amplifikaci pouze u markeru *IRAP 3*. Na elektroforéze bylo přítomno spektrum produktů PCR o různé délce, z nichž žádný nevykazoval polymorfismus mezi rodiči mapovací populace (obr. 20). Produkty PCR byly slabé a na gelu špatně viditelné.



Obr. 20: Elektroforetogram markeru *IRAP 3* na nedenuroující 4% PAA gelu

PCR byla provedena s DNA rodičů mapovací populace (A, B, H.) Žádný z pozorovaných produktů PCR nevykazoval polymorfismus mezi rodiči.

K – negativní kontrola, M – velikostní marker 100 bp ladder.

6 Diskuze

6.1 Metody pro vysokokapacitní analýzu mikrosatelitových markerů

6.1.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza poskytuje vysoké rozlišení (1 bp) (Smith *et al.*, 1998), velkou citlivost a rychlou separaci vzorků. Somers *et al.*, (2004) využil kapilární elektroforézu ke konstrukci mikrosatelitové genetické mapy u pšenice. V našem případě byla prováděna kapilární elektroforéza na sekvenátoru následovaná fragmentační analýzou. Alely polymorfních mikrosatelitových lokusů lišících se o 2 bp byly ve většině případů dobře rozlišitelné. Hodnocení bylo komplikováno přítomností *stutter* piků, které reprezentují vedlejší produkty PCR vznikající sklouzáváním DNA polymerázy. Výskyt těchto *stutter* piků je nejvyšší právě u mikrosatelitů s dinukleotidovými repeticemi. Kromě přítomnosti vedlejších produktů PCR bylo hodnocení výsledků ovlivněno také kvalitou použité DNA. Při použití DNA izolované kitem Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit byly získány dobře hodnotitelné výsledky. Pokud však byla použita DNA izolovaná vysokokapacitní metodou za použití kitu Agencourt[®] Genfind v2 bylo vyhodnocení některých výsledků nespolehlivé.

6.1.2 Elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidová gelová elektroforéza probíhající za nedenaturujících podmínek byla použita jako další metoda k analýze genotypu mikrosatelitových markerů. K tomuto účelu použili nedenaturující PAA elektroforézu např. McNeil *et al.* (2008) či Li *et al.*, (2009). Tato metoda má v literatuře své zastánce i odpůrce. Rodrigues *et al.* (2002) ve své práci demonstrují rozlišení polymorfismu o délce dvou párů bází a v některých případech dokonce 1 báze. Wang *et al.* (2003) provedli testování systému pro elektroforézu na nedenaturujícím PAA gelu, jenž je shodný se systémem používaným v naší laboratoři. Na základě analýzy několika polymorfních mikrosatelitových markerů zjistili, že na dané aparatuře je možno s jistotou rozlišit polymorfismus o velikosti 3 párů bází. Pro rozlišení rozdílu dvou párů bází je zapotřebí delší doby separace. Rozlišení 2 bp bylo demonstrováno na markeru *barc218* s délkami polymorfních PCR produktů 210 a 212 bp. Pro dokonalé rozlišení polymorfismu probíhala separace 3 hodiny. Podle autorů je tedy nedenaturující PAA elektroforéza vhodná pro analýzu genotypu za pomoci mikrosatelitových markerů. Naproti tomu Lareu *et al.* (1998) uvádí, že v nedenaturujícím

PAA gelu se mohou některé PCR produkty mikrosatelitových markerů chovat abnormálně v důsledku různé konformace molekul DNA. Toto způsobuje rozdíly v mobilitě produktů PCR a následně chybné vyhodnocení genotypu studovaných jedinců.

V této práci byla prováděna nedenaturující PAA elektroforéza s průběžným barvením produktů PCR ethidium bromidem přítomným v TBE pufru. Na gelu byl rozlišitelný polymorfismus pouze v případě markeru *cf_d14* (velikost produktu PCR je přibližně 150bp). U zbylých dvou markerů je velikost produktů PCR 209/211 bp (*cf_d68*) a 225/227 bp (*gwm473*). Aby bylo možno rozlišit tyto produkty, musela by separace trvat téměř dvojnásobnou dobu než v případě markeru *cf_d14*. Toto uvádí i Wang *et al.* (2003) na příkladu markeru *barc218*. Pokud byly v našem případě separovány produkty markeru *cf_d68*, jejichž délka je přibližně stejná jako u markeru *barc218*, byly proužky na gelu po třech hodinách separace silně rozostřené a polymorfismus byl nehodnotitelný. K rozostření proužků dochází patrně vlivem vyčerpání pufru nebo zvýšenou teplotou při dlouhém běhu elektroforézy. Z těchto výsledků vyplývá, že v případě polymorfismu délky dvou bází není tento systém vhodný pro všechny mikrosatelitové markery. Co se týče citlivosti barvení, je vizualizace PCR produktů pomocí ethidium bromidu zhruba třikrát méně citlivá než barvení stříbrem.

6.1.3 Elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza za denaturujících podmínek s použitím sekvenačního polyakrylamidového gelu umožňuje rozlišení až jedné báze a měla by tedy být vhodná pro spolehlivé rozlišení polymorfismu velikosti dvou bází (Schlötterer, 1998).

Separace mikrosatelitových markerů *cf_d14*, *cf_d68* a *gwm473* probíhala v 6% denaturujícím PAA gelu, s následnou vizualizací barvením stříbrem. Obdobný postup použili pro separaci produktů PCR mikrosatelitových lokusů ve svých pracích např. Guyomarc'h *et al.* (2002) či Peng *et al.* (2009). Tuto metodu použili k analýze alel mikrosatelitových lokusů lišících se o 2 a více bp. Mnou získané výsledky potvrdily, že s použitím tohoto systému je možno rozlišit polymorfismus o velikosti 2 bp. Alely polymorfních mikrosatelitových lokusů byly na gelu dobře rozlišitelné. Rozlišení bylo limitováno pouze kvalitou použité DNA. Stejně jako v případě kapilární elektroforézy hodnocení výsledků komplikovala přítomnost vedlejších produktů PCR (*stutter bandů*) charakteristických pro mikrosatelitové markery.

6.1.4 Kvalita použité DNA

Jak vyplynulo ze získaných výsledků, kvalita DNA značně ovlivňuje kvalitu detekce polymorfismu. Pokud byla pro PCR používána DNA izolovaná kitem Invisorb® Spin Plant Mini Kit, která byla dostatečně přečištěná, byly získané výsledky spolehlivě hodnotitelné. Bylo možné jednoznačně určit genotyp analyzovaných jedinců. Pokud však byla použita DNA izolovaná vysokokapacitní metodou za použití kitu Agencourt® Genfind v2, bylo v některých případech hodnocení genotypu sporné. Důvodem byla přítomnost silného pozadí, dále různá koncentrace jednotlivých vzorků, která souvisí se způsobem izolace, a také možná přítomnost kontaminace mezi vzorky v sousedních jamkách 96-jamkové misky.

6.2 Odvozování markerů za účelem zahuštění genetické mapy v oblasti genu *Dn_{CI2401}*

Za účelem zahuštění genetické mapy byly navrženy primery pro 52 potenciálních markerů, z toho 14 mikrosatelitových markerů, 33 markerů ISBP a 5 markerů IRAP. Ze všech otestovaných primerů poskytly polymorfni produkt pouze primery mikrosatelitového markeru *MS1*. Tyto primery amplifikují mikrosatelitový lokus odpovídající markeru *cf68*. Identifikaci polymorfismu při amplifikaci lokusu z jiných primerů bylo potvrzeno, že metoda elektroforézy v denaturujícím PAA gelu umožňuje spolehlivě identifikovat polymorfismy o délce 2 bp. Na nedenaturujícím PAA gelu se lokus markeru *MS 1* jevil jako monomorfní.

Co se týče markerů ISBP, ani u jednoho z 33 potenciálních markerů nebyl identifikován polymorfismus typu přítomnosti/nepřítomnosti PCR produktu. Oproti tomu Paux *et al.*, (2010) uvádí, že v jejich studii více než 50% všech ISBP markerů odvozených z genomu pšenice vykazovalo tento typ polymorfismu. Tento rozdíl patrně souvisí s tím, že Paux *et al.* hledali polymorfismy za použití 5 vzdálených rodičů mapovacích populací. Wanjugi *et al.*, (2009) se zabývali vývojem markerů RJM, které jsou odvozovány na stejném principu jako markery ISBP, pro genom D pšenice seté. 97% markerů odvozených z *Aegilops tauschii* amplifikovalo produkt i v pšenici, což svědčí o velmi nízké míře polymorfismu mezi D genomem pšenice a genomem jejího předchůdce. Z toho lze vyvodit, že úroveň polymorfismu markerů ISBP bude u D genomu jednotlivých linií pšenice ještě nižší. V našem případě nebyl polymorfismus nalezen ani na sekvenční úrovni, a to pro 8 analyzovaných markerů. Čtyři z těchto markerů byly jednoznačně monomorfní.

Mezi produkty PCR markerů *ISBP 24*, *ISBP 26*, *ISBP 27* a *ISBP 33* byl přítomen polymorfismus v rámci sekvencí jednoho i druhého rodiče. Stejně polymorfní varianty byly přítomny u obou rodičů a ti tak díky nim nebyli rozlišeni. V tomto případě mohlo dojít k výsktu amplifikovaného lokusu, který je přítomen na krátkém rameni chromozómu 7D, také na homeologních chromozómech genomů A a B. Identifikované polymorfimy však mohou představovat také chyby PCR, která předchází sekvenování.

Primery pro markery *ISBP* odvozené z kompletních sekvencí BAC klonů poskytovaly různý počet produktů PCR. V případě markerů *ISBP 15* a *ISBP 12* byl přítomen pouze jeden produkt, který byl zároveň specifický pro krátké rameno chromozómu 7D. V tomto případě je tedy v genomu přítomen unikátní lokus nacházející se s největší pravděpodobností pouze na rameni 7DS. Produkty PCR těchto markerů by bylo možné osekvenovat a zjistit tak, zda není přítomen polymorfismus na sekvenční úrovni. U dalších markerů došlo kromě amplifikace 7DS specifického produktu k amplifikaci dalších lokusů, které nebyly specifické pro 7DS. Mohlo jít buď o paralogní lokus vzniklý v důsledku duplikace, nebo o odlišný lokus, k němuž byly použité primery částečně komplementární. Tato varianta je pravděpodobnější, protože přídavné produkty byly obvykle slabší než produkt odpovídající lokusu na 7DS. V případě markeru *ISBP 7* došlo k amplifikaci produktu pouze u pozitivní kontroly (7DS). Lokus byl tedy amplifikován pouze v odrůdě Chinese Spring, podle jejíž sekvence byly navrženy primery. K absenci produktu u rodičů mapovací populace mohlo dojít z důvodu nepřítomnosti daného lokusu v jejich DNA, případně z důvodu značné odlišnosti v sekvenci DNA rodičů, v oblasti komplementární k navrženým primerům.

V případě markerů *IRAP*, došlo k amplifikaci produktů pouze u jednoho markeru. Mezi rodiči nebyl nalezen polymorfismus. Ostatní primery pro markery *IRAP* neamplifikovaly produkt pravděpodobně proto, že byly od sebe retroelementy příliš vzdáleny. Jiným důvodem může být odlišnost v místě nasedání primeru v odrůdě Chinese Spring (na jejíž sekvence byly navrženy primery) a v linii CI 2401 a odrůdě Glupro, které představují rodiče mapovací populace (Kalendar *et al.*, 1999).

Získané výsledky poukazují na velmi nízkou úroveň polymorfismu mezi rodiči mapovací populace. To může souviset se skutečností, že gen *Dn_{CI2401}* je lokalizován v subgenomu D pšenice. Tento genom je evolučně mladý (k hybridizaci s tetraploidním druhem *Triticum turgidum* došlo před 8 000 lety), a proto vykazuje velmi nízkou úroveň polymorfismu ve srovnání s ostatními subgenomy pšenice (Bossolini *et al.*, 2006).

7. Závěr

V této práci byly porovnány detekční metody vhodné pro analýzu genotypu mikrosatelitových markerů *cf14*, *cf68* a *gwm473* v rámci použité mapovací populace F_{2:3}. Srovnávána byla kapilární elektroforéza, elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu a elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Kapilární elektroforéza a elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu se ukázaly jako metody vhodné pro analýzu mikrosatelitových markerů ve velkém měřítku. Tyto dvě metody jsou z hlediska rozlišení srovnatelné. Obě metody umožňují rozlišit délkový polymorfismu o velikosti dvou nukleotidů, který byl přítomen u výše zmíněných markerů. Proces zpracování vzorků při použití elektroforézy v denaturujícím PAA gelu si žádá delší čas než v případě kapilární elektroforézy, kapilární elektroforéza je však oproti elektroforéze v denaturujícím PAA gelu více finančně náročná. Elektroforéza v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu byla vyhodnocena jako nevhodná pro analýzu mikrosatelitových markerů z důvodu malého rozlišení gelu a špatné reprodukovatelnosti výsledků. Na hodnocení výsledků měla vliv také kvalita použité DNA. Při použití DNA izolovaná kitem Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit byly získané výsledky spolehlivě hodnotitelné. Pokud však byla použita DNA izolovaná vysokokapacitní metodou za použití kitu Agencourt[®] Genfind v2, bylo v některých případech hodnocení genotypu sporné z důvodu přítomnosti pozadí, rozdílné koncentrace vzorků a jejich možné vzájemné kontaminace.

Dále byly ze známých sekvencí BAC klonů z knihovny specifické pro krátké rameno chromozómu 7D odvozeny primery pro různé typy markerů s cílem zahustit genetickou mapu v oblasti genu *Dn_{CI2401}*. Primery byly navrženy pro 52 potenciálních markerů z oblasti studovaného genu. Jednalo se o 14 mikrosatelitových markerů, 33 markerů ISBP a 5 markerů IRAP. Tyto markery byly testovány na přítomnost polymorfismu mezi rodiči mapovací populace. Z celkového počtu 52 potenciálních markerů poskytoval polymorfnní produkt pouze mikrosatelitový marker *MS1*, jehož primery byly navrženy do oblasti mikrosatelitového lokusu, jenž je amplifikován také z primerů pro marker *cf68*. Získané výsledky poukazují na velmi nízkou úroveň polymorfismu mezi rodiči, z nichž byla odvozena mapovací populace.

8 Seznam zkratek

1C	C hodnota, množství jaderné DNA v nereplikovaném haploidním jádře
A	adenin
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
BAC	umělý bakteriální chromozóm (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BC	populace zpětných kříženců (<i>backcross population</i>)
BES	sekvence konce BAC klonu (<i>BAC-end sequence</i>)
bp	páry bází (base pairs)
C	cytosin
CAPS	štěpené amplifikované polymorfni sekvence (<i>cleaved amplified polymorphic sequences</i>)
cM	centimorgan
DHL	dihaploidní linie (<i>double haploid line</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
EST	místo se sekvenční adresou (<i>expressed sequence tag</i>)
F primer	forward primer
F₁	první filiální generace
F₂	druhá filiální generace
F_{2:3}	F ₃ populace odvozená z populace F ₂ (<i>F₂ derived F₃</i>)
Fext	prodloužený forward primer
G	guanin
Gb	miliardy párů bází (giga base pairs)
IRAP	amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozóny (<i>inter-retrotransposon amplified polymorphism</i>)
ISBP	polymorfismus založený na místě inserce (<i>insertion site-base polymorphism</i>)
ISSR	<i>inter-simple sequence repeats</i>
LTR	dlouhá koncová repetice (<i>long terminal repeat</i>)
MAS	selekce za pomoci markeru (<i>marker assisted selection</i>)
Mb	milióny párů bází (<i>mega base pairs</i>)
n	haploidní počet chromozómů

NIL	téměř izogenní linie (<i>nearly isogenic line</i>)
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
QTL	lokusy pro kvantitativní znaky (<i>quantitative trait loci</i>)
R primer	reverse primer
r	frekvence rekombinace
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA (<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>)
RBIP	<i>retrotransposon-based insertion polymorphism</i>
REMAP	amplifikovaný polymorfismus mikrosatelit – retrotranspozón (<i>retrotransposon - microsatellite amplified polymorphism</i>)
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RIL	rekombinantní inbrední linie (<i>recombinant inbred line</i>)
RJM	markery ze styčných bodů repetit (<i>repeat-junction markers</i>)
RNáza	ribonukleáza
rpm	otáčky za minutu (<i>rotations per minute</i>)
SCAR	amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (<i>sequence characterized amplified region</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSCP	polymorfismus konformace jednořetězcové DNA (<i>single strand conformation polymorphism</i>)
SSR	mikrosatelit (<i>simple sequence repeat</i>)
T	thymin
T_a	teplota nasedání primeru (<i>annealing temperature</i>)
x	základní chromozómové číslo

9 Použitá literatura

- Alpert, K. B., Tanksley, S. D. (1996): High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2.2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 15503–15507.
- Bartoš, J., Paux, E., Kofler, R., Havránková, M., Kopecký, D., Suchánková, P., Šafář, J., Šimková, H., Town, C. D., Lelley, T., Feuillet, C., Doležel, J. (2008): A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biology* 8: 95.
- Basky, Z. (2002): Biotypic variation in Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Kurdjumov Homoptera: Aphididae) between Hungary and South Africa. *Cereal Research Communication* 30: 133 - 139.
- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- Batley, J., Mogg, R., Edwards, D., O'Sullivan, H., Edwards, K. J. (2003): A high-throughput SNUPE assay for genotyping SNPs in the flanking regions of *Zea mays* sequence tagged simple sequence repeats. *Molecular Breeding* 11: 111-120.
- Bennett, M. D., Smith, J. B. (1991): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society (Biological Sciences)* 334: 309 – 345.
- Bishop, M. D., Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., Sunden, S. L. F., Hawkins, G. A., Solinas Toldo, S., Fries, R., Grosz, M. D., Yoo, J., Beattie, G. W. (1996): A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136: 619-639.
- Borner, A., Schumann, E., Furst, A., Coster, H., Leithold, B., Roder, M. S., Weber, W. E. (2002): Mapping of quantitative trait loci determining agronomically important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 921-936.
- Bossolini, E., Krattinger, S. G., Keller, B. (2006): Development of simple sequence repeat markers specific for the Lr34 resistance region of wheat using sequence information from rice and *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1049-1062 .
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Boyko, E., Kalendar, R., Korzun, V., Fellers, J., Korol, A., Sculman, A. H., Gill, B. S. (2002): A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defence-related genes: insights into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology* 48: 767-790.

- Castro, A. M., Vasicek, A., Ellerbrook, C., Giménez, D. O., Tocho, E., Tacaliti, M. S., Clúa, A., Snape, J. W. (2004): Mapping quantitative trait loci in wheat for resistance against greenbug and Russian wheat aphid. *Plant Breeding* 123: 361-365.
- Collins, F.S., Brooks, L.D., Chakravarti, A. (1998): A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research* 8: 1229–1231.
- Devaux, P., Kilian, A., Kleinhofs, A. (1995): Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination-derived, doubled haploid populations. *Molecular Genetics and Genomics* 249: 600-608.
- Devos, K. M., Ma, J. X., Pontaroli, A. C., Pratt, L. H., Bennetzen, J. L. (2005): Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 19243–19248.
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., Weissenbach, J. (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellite. *Nature* 380: 152-154.
- Doležel, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Šafář, J., Suchánková, P., Číhalíková, J., Bartoš, J., Valárik, M. (2009): Chromosome genomics in *Triticeae*. In: Feuillet, C., Muehlbauer, G. J. (eds): *Genetics and genomics of the Triticeae*. Springer Science. + Business Media, Llc, New York.
- Dong, H., Quick, J.S., Zhang, Y. (1997): Inheritance and allelism of Russian wheat aphid resistance in several wheat lines. *Plant Breeding* 116: 449-453.
- Donini, P., Law, J. R., Koebner, R. M. D., Reeves, J. C., Cooke, R. J. (2000): Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 912-917.
- Doveri, S., Lee, D., Maheswaran, M., Powell, W. (2008): Molecular markers – history, features and applications. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping*. pp. 23 – 68. Science Publishers, Enfield.
- Du Toit, F. (1987): Resistance in wheat (*Triticum aestivum*) to *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Cereal Research Communications* 15: 175–179.
- Ennahli, S., El Bouhssini, M., Grando, S., Anathakrishnan, R., Niide, T., Starkus, L., Starkey, S., Smith, C. M. (2009): Comparison of categories of resistance in wheat and barley genotypes against biotype 2 of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov). *Arthropod-plant Interactions* 3: 45-53.
- Feuillet, C , Langridge, P., Waugh, R. (2008): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends In Genetics* 24: 24-32.
- Flavell, A. J., Knox, M. R., Pearce, S. R., Ellis, T. H. N. (1998): Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant Journal* 16: 643–650.

- Franzen, L. D., Gutsche, A. R., Heng-Moss, T. M., Higley, L. G., Macedo, T. B. (2008): Physiological responses of wheat and barley to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) and bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *Arthropod-plant Interactions* 2: 227-235.
- Ganal, M. V., Röder, M. S. (2007): Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. In: Varshney, R. K., Tuberosa, R. (eds): *Genomics-Assisted Crop Improvement, Vol 2: Genomics Applications in Crops*, pp. 1 – 24. Springer, Dordrecht.
- Gupta, P. K., Balyan, H. S., Edwards, K. J., Isaac, P., Korzun, V., Roder, M., Gautier, M. F., Joudrier, P., Schlatter, A. R., Dubcovsky, J., De la Pena, R. C., Khairallah, M., Penner, G., Hayden, M. J., Sharp, P., Keller, B., Wang, R. C. C., Hardouin, J. P., Jack, P., Leroy, P. (2002): Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 413-422.
- Gustafson, P., Raskina, O., Ma, X., Nevo, E. (2009): Wheat evolution, domestication, and improvement. In: Carver, B. F. (ed): *Wheat science and trade*. pp. 3 – 30, Wiley-Blackwell, Iowa.
- Gutsche, A. R., Heng-Moss, T. M., Higley, L. G., Sarath, G., Mornhinweg, D. W. (2009): Physiological responses of resistant and susceptible barley, *Hordeum vulgare* to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko). *Arthropod-plant Interactions* 3: 233-240.
- Guyomarc'h, H., Sourdille, P., Charmet, G., Edwards, K. J., Bernard, M. (2002): Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1164–1172
- Haldane, J. B. S. (1919): The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.
- Harvey, T. L., Martin, T. J. (1990): Resistance to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, in wheat (*Triticum aestivum*). *Cereal Research Communication*. 18: 127 - 129.
- Hittalmani, S., Girish, T. N., Biradar, H. Maughan, P. J. (2008): Mapping populations: Development, descriptions and deployment. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping*. pp. 69 – 92. Science Publishers, Enfield.
- Huang, X. Q., Coester, H., Ganal, M. W., Roeder, M. S. (2003): Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1379-1389.
- Huang, X. Q., Kempf, H., Ganal, M. W., Roder, M. S. (2004): Advanced backcross QTL analysis in progenies derived from a cross between a German elite winter wheat variety and a synthetic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 933-943.

- Ching, A., Caldwell, K. S., Maurine Dolan, J. M., Smith, O. S., Tingey, S., Morgante, M., Rafalski, A. J. (2002): SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3: 19.
- Christiansen, M. J., Andersen, S. B., Ortiz, R. (2002): Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century. *Molecular Breeding* 9: 1–11.
- Jones, E., Chu, W.-C., Ayele, M., Ho, J., Bruggeman, E., Yourstone, K., Rafalski, A., Smith, O. S., McMullen, M. D., Bezawada, C., Warren, J., Babayev, J., Basu, S., Smith, S. (2009): Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for use in commercial maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Molecular Breeding* 24: 165-176.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina M, Suoniemi A, Schulman, A. (1999): IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704-711.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E., Schulman, A. H. (2000): Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by Bare-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6603-6607.
- Keller, B., Feuillet, C., Yahiaoui, N. (2005): Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a superset genome. *Genetics Research Cambridge* 85: 93 - 100.
- Kofler, R., Schlotterer, C., Lelley, T. (2007): SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*, 23: 1683-1685.
- Kole ,C., Abbott, A. G. (2008): Fundamentals of plant genome mapping. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping. pp. 1 – 22. Science Publishers, Enfield.
- Kosambi, D. D. (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12: 172-175.
- Krejča, J., Korbel, L. (2001): Velká kniha živočichů. Příroda, Bratislava.
- Kůdela, V., Bartoš., P., Čača, Z., Dirlbek, J. (1989): Obecná fytopatologie. Academia, Praha.
- Kwok, P. Y., Deng, Q., Zakeri, H., Nickerson, D. A. (1996): Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics* 31: 123-126.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., Newburg, L. (1987): MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.

- Lareu, V., Pestoni, C., Phillips, C., Barros, F., Court, D. S., Lincoln, P., Carracedo, A. (1998): Normal and anomalous electrophoretic behavior of polymerase chain reaction-based DNA polymorphisms in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 19: 1566-1572.
- Levinson, G., Gutman, G. A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203–221.
- Li, G. Q., Fang, T. L., Zhang, H. T., Xie, C. J., Li, H. J., Yang, T. M., Nevo, E., Fahima, T., Sun, Q. X., Liu, Z. Y. (2009): Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene Pm41 on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theoretical and Applied Genetics* 119: 531-539.
- Lister, C., Dean, C. (1993): Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 4: 745–750.
- Litt, M., Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- Liu, X. M., Smith, C. M., Gill, B. S. (2002): Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes Dn4 and Dn6. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1042-1048.
- Liu, X. M., Smith, C. M., Gill, B. S., Tolmay, V. (2001): Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. *Theoretical Applied Genetics* 102: 504–510.
- Marais, G. F., Du Toit, F. (1993): A monosomic analysis of Russian wheat aphid resistance in the common wheat PI 294994. *Plant Breeding* 111: 246–248.
- Marais, G. F., Horn, M., Du Toit, F. (1994): Intergeneric transfer (rye to wheat) of a gene(s) for Russian wheat aphid resistance. *Plant Breeding* 113: 265–271.
- Marais, G. F., Wessels, W. G., Horn, M. (1998): Association of a stem rust resistance gene (Sr45) and two Russian wheat aphid resistance genes (Dn5 and Dn7) with mapped structural loci in common wheat. *The South African Journal of Plant and Soil* 15: 67–71.
- Markert, C. L., Moller, F. (1959): Multiple forms of enzymes. tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45: 753-763.
- Martin, T. J., Sears, R. G., Seifers, D. L., Harvey, T. L., Witt, M. D., Schlegel, A. J., McCluskey, P. J., Hatchett, J. H. (2001): Registration of Trego wheat. *Crop Science* 41: 929 - 930.
- McNeil, M. D., Kota, R., Paux, E., Dunn, D., McLean, R., Feuillet, C., Li, D., Kong, X., Lagudah, E., Zhang, J. C., Jia, J. Z., Spielmeyer, W., Bellgard, M., Appels, R. (2008): BAC-derived markers for assaying the stem rust resistance gene, Sr2, in wheat breeding programs. *Molecular Breeding* 22: 15 – 24.

- Mihovilovich, E., Simon, R., Bonierbale, M. (2008): Construction of genetic linkage maps. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping. pp. 93 – 138. Science Publishers, Enfield.
- Murigneux, A., Baud, S., Beckert, M. (2004): Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. 2. Comparison with single-seed-descent lines. *Theoretical Applied Genetics* 87: 278-287.
- Nguyen, H.T., Wu, X. (2005): Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping, pp. 23 - 52, Wiley-WCH, Weinheim.
- Nkongolo, K. K., Quick, J. S., Limin, a. E., Fowler, D. B. (1991): Sources and inheritance of resistance to russian wheat aphid in triticum species amphiploids and *Triticum tauschii*. *Canadian Journal of Plant Science* 71: 703-708.
- O'Donoghue, L. S., Kianian, S. F., Rayapati, P. J., Penner, G. A., Sorrells, M. E. Tanksley, S. D., Phillips, R. L., Rines, H. W., Lee, M., Fedak, G., Molnar, S. J., Hoffman D., Salas, C. A., Wu, B., Autrique, E., Vandeynze, A. (1995): Molecular linkage map of cultivated oat. *Genome* 38: 368–380.
- Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J.-P., Sourdille, P., Balfourier, F., Le Paslier, M.-C., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B., Feuillet, C. (2010): Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8: 196-210.
- Paux, E., Roger, D., Badaeva, E., Gay, G., Bernard, M., Sourdille, P., Feuillet, C. (2006): Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant Journal* 48: 463–474.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Šafář, J., Šimková, H., Doležel, J., Bernard, M. and Feuillet, C. (2008): A physical map of the 1Gb bread wheat chromosome 3B. *Science* 322: 101– 104.
- Peng, J. H. ,Bai, Y., Haley, S. D., Lapitan, N. L.V. (2009): Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid. *Genetica* 135: 95-122.
- Peng, J. H., Wang, H., Haley, S. D., Peairs, F. B., Lapitan, N. L. V. (2007): Molecular mapping of the Russian wheat aphid resistance gene Dn2414 in wheat. *Crop Science* 47: 2418–2429.
- Perretant, M. R., Cadalen, T., Charmet, G., Sourdille, P., Nicolas, P., Boeuf, C., Tixier, M. H., Branlard, G., Bernard, S., Bernard, M. (2000): QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1167-1175.

- Pestsova, E., Ganal, M. W., Roder, M. S. (2000): Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689-697.
- Pestsova, E., Roder, M. (2002): Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 84-91.
- Puterka, G. J., Burd, J. D., Burton, R. L. (1992): Biotypic variation in a worldwide collection of Russian wheat aphid (Homoptera : Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 85: 1497-1506.
- Randolph, T. L., Peairs F. B., Kroening, M. K., Armstrong, J. S., Hammon, R. W., Walker, C. B., Quick, J. S. (2003): Plant damage and yield response to the Russian wheat aphid (Homoptera : Aphididae) on susceptible and resistant winter wheats in Colorado. *Journal of Economic Entomology* 96: 352 - 360.
- Röder, M. S., Huang, X.-Q., Ganal, M. V. (2004): Wheat microsatellites: potential and implications. In: Lörz, H., Wenzel, G. (eds): *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 55. Molecular marker systems, pp. 255 – 266. Springer, Berlin Heidelberg.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., Ganal, M. W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023 .
- Rodríguez, S., Zapata, C. (2002): Typing dinucleotide repeats under nondenaturing conditions with single-base resolution and high sizing precision. *Molecular Biotechnology* 21: 117-122.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds): *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, pp. 365-386, Humana Press, Totowa
- Saghai Maroof M. A., Biyashev, R. M., Yang G. P., Zhang, Q., Allard, R. W. (1994): Extraordinarily polymorphic microsatellite dna in barley - species-diversity, chromosomal locations, and population-dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5466-5470.
- Saidi, A., Quick, J. S. (1996). Inheritance and allelic relationships among Russian wheat aphid resistance genes in winter wheat. *Crop Science* 36: 256 - 258.
- Schlötterer, C. (1998): Microsatellites. In: Hoelzel, A. R. (ed): *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*, pp. 237–261. Oxford University Press, New York.
- Schneider, K., *Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping* (2005). In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 3 - 22, Wiley-WCH, Weinheim.
- Smith, A., Nelson, R. J. (1998): Capillary electrophoresis of DNA. In: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Stuhl, K. (eds): *Current protocols in molecular biology*, Vol.1. Wiley & Sons, New York.

- Smith, C. M. (2005): Plant resistance to arthropods. Molecular and conventional approaches. Springer, Dordrecht.
- Smith, C. M., Belay, T., Stauffer, C., Stary, P., Kubeckova, I., Starkey, S. (2004b): Identification of Russian wheat aphid (Homoptera : Aphididae) populations virulent to the Dn4 resistance gene. *Journal of Economic Entomology* 97: 1112-1117.
- Smith, C. M., Havlickova, H., Starkey, S., Gill B. S., Holubec, V. (2004a): Identification of *Aegilops* germplasm with multiple aphid resistance. *Euphytica* 135: 265-273.
- Smith, D. B., Flavell, R. B. (1975): Characterisation of the wheat genome by renaturation kinetics. *Chromosoma* 50: 223 – 242.
- Somers, D. J., Isaac, P., Edwards, K. (2004): A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1105-1114.
- Somers, D. J., Kirkpatrick, R., Moniwa, M., Walsh, A. (2003): Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome* 46: 431-437.
- Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Gill, B. S., Ward, R., Cregan, P. B. (2005): Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 550-560.
- Stam, P. (1993): Construction of integrated linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. *The Plant Journal* 5: 739–744.
- Šafář, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Číhalíková, J., Suchánková, P., Bartoš, J., Doležel, J. (2010): Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenetic and Genome Research*, v tisku.
- Šimková, H., Svensson, J. T., Condamine, P., Hřibová, E., Suchánková, P., Bhat, P.R., Bartoš, J., Šafář, J., Close, T.J., Doležel, J. (2008): Coupling amplified DNA from flow-sorted chromosomes to high-density SNP mapping in barley. *BMC Genomics* 9: 294.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Teo, C. H., Tan, S. H., Ho C. L., Faridah, Q. Z., Othman, Y. R., Heslop-Harrison, J. S., Kalendar, R., Schulman, A. H. (2005): Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. *Journal of Plant Biology* 48: 96-105.
- This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G. S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibanez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C. P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E. (2004): Development of a standard set of microsatellite reference

- alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1448-1458.
- Voothuluru, P., Meng, J., Khajuria, C., Louis, J., Zhu, L., Starkey, S., Wilde, G. E., Baker, C. A., Smith, C. M. (2006): Categories and inheritance of resistance to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) biotype 2 in a selection from wheat cereal introduction 2401. *Journal of Economic Entomology* 99: 1854-1861.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Fornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.
- Vroh Bi, I., McMullen, M. D., Sanchez-Villeda, H., Schroeder, S., Gardiner, J., Polacco, M., Soderlund, C., Wing, R., Fang, Z., Coe E. H. (2005): Single nucleotide polymorphisms and insertion–deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Science* 46:12–21.
- Vukich, M., Schulman, A. H., Giordani, T., Natali, L., Kalendar, R., Cavallini, A. (2009): Genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and in the *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1027-1038.
- Wang, D., Shi, J., Carlson, S. R., Cregan, P. B., Ward, R. W., Diers, B. W. (2003): A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Science* 43: 1828-1832.
- Wang, G. L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Champoux, M. C., Nelson, R. J. (1994): RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* 136: 1421–1434.
- Wanjugi, H., Coleman-Derr, D., Huo, N., Kianian, S. F., Luo, M. C., Wu, J., Anderson, O., Gu, Y. Q. (2009): Rapid development of PCR-based genome-specific repetitive DNA junction markers in wheat. *Genome* 52: 576–587.
- Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain-reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213–7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531– 6535.
- Wu, K. S., Tanksley, S. D. (1993): Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics* 241: 225–235.

Zhang, J., Guo, W., Zhang, T. (2002): Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. x *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. *Theoretical Applied Genetics* 105: 116-1174.

Zhu, Y. L., Song, Q. J., Hyten, D. L., Van Tassell, C. P., Matukumalli, L. K., Grimm, D. R., Hyatt, S. M., Fickus, E. W., Young, N. D., Cregan, P. B. (2003): Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics* 163: 1123-1134 .